

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991409** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2014.08.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/38** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ИНГИБИТОРУ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА 1 (PAI-1) И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/865,451; 14305757.8

(32) 2013.08.13; 2014.05.22

(33) US; EP

(62) 201690377; 2014.08.13

(71) Заявитель:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
**Притскер Алла (US), Грэль Патрик,
Рак Алексей, Матье Магали (FR),
Морган Кристофер Райан (US),
Борен Николя, Пуарье Брюно, Даве
Сириль, Дюффье Франсис (FR), Ли
Хань, Коминос Доротеа (US), Жаниак
Филип (FR)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены антитела, специфически связывающиеся с ингибитором активатора плазминогена 1 типа (PAI-1). В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела к PAI-1, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител или их фрагментов. Также представлены способы применения антител для модулирования активности PAI-1 или обнаружения PAI-1 in vitro либо in vivo. В настоящем изобретении дополнительно представлены способы получения антител, специфически связывающихся с PAI-1 в активном конформационном состоянии.

201991409

A2

A2

201991409

АНТИТЕЛА К ИНГИБИТОРУ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА 1 (РАІ-1) И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/865451, поданной 13 августа 2013 г., и заявке на Европейский патент № 14305757.8, поданной 22 мая 2014 г., которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ингибитор активатора плазминогена 1 типа (РАІ-1) является основным ингибитором тканевого активатора плазминогена (tPA) и урокиназного активатора плазминогена (uPA), ключевых сериновых протеаз, отвечающих за образование плазмينا. РАІ-1 регулирует фибринолиз путем ингибирования активации плазминогена в сосудистом компартменте. Фибринолиз является четко координированным процессом разрушения фибриновых сгустков, образующихся при активации системы свертывания крови. Нарушение регуляции баланса свертывание/фибринолиз приводит к аномальным событиям гемостаза, таким как кровотечение или тромботические заболевания. РАІ-1 также является ключевым регулятором активации плазминогена в окологклеточном компартменте (внутрисосудистом и тканевом), где связанный с рецептором плазминоген активируется главным образом урокиназой, связанной с рецептором урокиназы (uPAR). Путем ингибирования окологклеточного протеолиза РАІ-1 регулирует многочисленные клеточные функции, такие как разрушение внеклеточного матрикса (ЕСМ), активация факторов роста и их высвобождение из ЕСМ, активация матриксных металлопротеиназ (ММР) и апоптоз клеток. Недавно были идентифицированы независимые от протеаз эффекты РАІ-1 за счет его взаимодействия с кофакторами (такими как витронектин, гепарин, гликозаминогликан), комплексами uPAR-урокиназа, или клеточными рецепторами (LRP: белок, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности), или интегринами, влияющие на функции клеток, такие как адгезия/дезадгезия, миграция, пролиферация и внутриклеточная биологическая активность.

Благодаря этим клеточным механизмам и антифибринолитическим эффектам была установлена патогенная роль PAI-1 в росте и метастазировании опухолей, фиброзе, остром инфаркте миокарда и нарушениях обмена веществ, таких как атеросклероз, ожирение и сахарный диабет.

Ген SERPINE1 (PAI-1) человека локализован в хромосоме 7, состоит из восьми интронов и девяти экзонов и имеет размер 12169 оснований (Klinger, K.W. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8548, 1987). PAI-1 является одноцепочечным гликопротеином размером примерно 50 кДа (379 аминокислот) из суперсемейства SERPIN (ингибитор сериновых протеаз), который синтезируется в активной конформации, но самопроизвольно становится неактивным в отсутствие витронектина (Vn). Витронектин, основной кофактор PAI-1, стабилизирует активную конформацию с помощью петли реакционного центра (RCL), содержащей примерно 20 аминокислот, находящихся на поверхности. Механизм ингибирования двух основных мишеней PAI-1 (tPA и uPA) представляет собой суицидное ингибирование. Область RCL PAI-1 содержит пептидную связь-"приманку" (R346-M347, также называемую P1-P'1), которая содержит участок расщепления для этой сериновой протеазы. Вначале образуется комплекс Михаэлиса с tPA или uPA, затем каталитическая триада реагирует с пептидной связью-"приманкой" с образованием комплекса ацил-фермент, который после расщепления пептидной связи P1-P'1 вызывает существенные конформационные изменения. Конформационные изменения обуславливают вставку расщепленной RCL в β -нить, при этом протеаза остается ковалентно связанной с PAI-1 в виде ацил-фермента. В нефизиологических условиях гидролиз данного комплекса ацил-фермент может приводить к высвобождению расщепленного PAI-1 и свободной активной протеазы (Blouse et al., *Biochemistry*, 48:1723, 2009).

PAI-1 циркулирует в крови при чрезвычайно изменчивых уровнях (в диапазоне нМ) и в избытке по сравнению с концентрациями t-PA или uPA. PAI-1 проявляет структурную гибкость и может находиться в одной из трех конформаций: (1) неактивной конформации, (2) активной конформации или (3)

субстратной конформации (см. фигуру 1). PAI-1 обнаруживается главным образом в виде нековалентного комплекса с витронектином ($K_d \sim 1$ нМ), который снижает переход в неактивное состояние в 1,5–3 раза. Сродство неактивного, расщепленного или находящегося в составе комплекса PAI-1 к витронектину значительно снижено. Витронектин, связанный с матриксом, также локализован вместе с PAI-1 в околкеклеточном пространстве. Эндотелиальные клетки, моноциты, макрофаги и гладкомышечные клетки сосудов синтезируют этот PAI-1, который затем может храниться в больших количествах в неактивной форме в тромбоцитах (в α -грануле). PAI-1 является быстродействующим и специфичным ингибитором (при этом константа скорости реакции второго порядка составляет 10^6 – 10^7 $M^{-1}s^{-1}$) tPA и uPA в растворе, но неактивным в отношении протеаз, связанных либо с фибрином, либо с их клеточными рецепторами. Другие протеазы, такие как тромбин, плазмин, активированный белок C, также могут ингибироваться PAI-1, но менее эффективно.

Несколько вариантов 3D-структуры PAI-1 человека было раскрыто после описания первой из них в 1992 г. (Mottonen *et al.*, *Nature* 355:270, 1992) в неактивной конформации. Эти 3D-структуры включают мутантные формы PAI-1 в субстратной (Aertgeerts *et al.*, *Proteins* 23:118, 1995), стабилизированной активной конформации (Sharp *et al.*, *Structure* 7:111, 1999), в виде PAI, образующего комплекс с соматомедин В-подобным доменом витронектина (Zhou *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 10:541, 2003), или с ингибирующим пентапептидом из RCL-петли (Xue *et al.*, *Structure* 6:627, 1998). В последнее время структуру PAI-1 мыши в неактивной конформации выяснили Dewilde *et al.* (*J Struct. Biol.* 171:95, 2010), и они выявили различия относительно PAI-1 человека в положении RCL, "области ворот" и положении α -спирали А. Взаимосвязи структура/функция в PAI-1 исследовали с использованием более чем 600 мутантных белков (обзор De Taeye *et al.*, *Thromb. Haemost.* 92:898, 2004) для определения локализации доменов, участвующих в различных видах активности данного многофункционального Serpin.

Поскольку PAI-1 может синтезироваться клетками практически

любого типа, в том числе гепатоцитами, адипоцитами, мезангиальными клетками, фибробластами, миофибробластами и эпителиальными клетками, его экспрессия в значительной степени варьирует при физиологических (например, суточное изменение уровня PAI-1 в плазме крови) и патологических состояниях (например, ожирение, метаболический синдром, инсулинорезистентность, инфекция, воспалительные заболевания, рак). PAI-1 считается белком острой фазы. Транскрипционная регуляция экспрессии мРНК PAI-1 индуцируется некоторыми цитокинами и факторами роста (например, $TGF\beta$, $TNF\alpha$, EGF, FGF, инсулином, ангиотензином II и IV), гормонами (например, альдостероном, глюкокортикоидами, PMA, высоким уровнем глюкозы) и стресс-факторами (например, гипоксией, активными формами кислорода, липополисахаридами).

Кроме того, полиморфизм промотора (положение -675) гена PAI-1 влияет на уровень экспрессии. Аллель 4G повышает уровень PAI-1, а вариант 4G/4G (встречающийся примерно у 25% популяции) вызывает повышение уровня PAI-1 в плазме крови примерно на 25% по сравнению с 5G/5G (встречаемость 25%, а у 4G/5G встречаемость 50%). Была установлена связь полиморфизма 4G/4G с инфарктом миокарда (Dawson *et al.*, *Arterioscler Thromb.* 11:183, 1991), определенным типом легочного фиброза (идиопатической интерстициальной пневмонией) (Kim *et al.*, *Mol Med.* 9:52, 2003), а генотип 4G/4G у группы доноров является независимым фактором риска отторжения трансплантата почки вследствие интерстициального фиброза и атрофии канальцев (Rerolle *et al.*, *Nephrol. Dial. Transplant* 23:3325, 2008).

PAI-1 рассматривали в качестве причины нескольких патогенных ролей в тромботических заболеваниях, таких как артериальный и венозный тромбоз, острый инфаркт миокарда и атеросклероз. Широко известно его вовлечение в нарушения обмена веществ, такие как синдром инсулинорезистентности и ожирение. PAI-1 также известен как профибротический фактор для некоторых органов, и была показана его сверхэкспрессия в фиброзных тканях (т.е. в печени, легком, почке, сердце, спайках брюшной полости,

коже: при рубцевании или склеродермии) (обзор Ghosh and Vaughan, *J. Cell Physiol.* 227:493, 2012). Мыши с нокаутом (KO) PAI-1 защищены от фиброза при различных моделях, как, например, в печени (перевязка желчного протока или воздействие ксенобиотиков), почке (модель односторонней обструкции мочеточника (UUO)), легких (вдыхание блеомицина) (Bauman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 120:1950, 2010; Hattori *et al.*, *Am. J. Pathol.* 164:1091, 2004; Chuang-Tsai *et al.*, *Am. J. Pathol.* 163:445, 2003), тогда как в сердце данная делеция защищает от индуцированного фиброза (Takeshita *et al.*, *Am. J. Pathol.* 164:449, 2004), но приводит к зависящему от возраста кардиоселективному фиброзу (Moriwaki *et al.*, *Circ. Res.* 95:637, 2004). Сообщалось, что снижение уровня экспрессии PAI-1 с помощью siRNA (Senoo *et al.*, *Thorax* 65:334, 2010) или его ингибирование химическими соединениями (Izuhara *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:672, 2008; Huang *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46:87, 2012) снижает интенсивность фиброза легких, тогда как сверхэкспрессия PAI-1 дикого типа (Eitzman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 97:232, 1996) или мутантного PAI-1, сохраняющего только функцию связывания с витронектином, но не ингибирования tPA, обостряет фиброз легких (Courey *et al.*, *Blood* 118:2313, 2011).

Фиброз печени, вызванный перевязкой желчного протока (BDL), ослабляется антителом, нейтрализующим PAI-1 (патент США № 7771720), тогда как снижение уровня экспрессии с помощью siRNA ослабляет фиброз печени, вызванный BDL и ксенобиотиками (Hu *et al.*, *J. Hepatol.* 51:102, 2009). Мыши с KO PAI-1 были защищены от поражения печени, индуцированного холестазом, и фиброза при BDL (Bergheim *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:592, 2006; Wang *et al.*, *FEBS Lett.* 581:3098, 2007; Wang *et al.*, *Hepatology* 42:1099, 2005), а также от фиброза печени, индуцированного ангиотензином II (Beier *et al.*, *Arch. Bioch. Biophys.* 510:19, 2011).

Мыши с KO PAI-1 защищены от почечного фиброза в модели UUO (Oda *et al.*, *Kidney Int.* 60, 587, 2001), при диабетической нефропатии (Nicholas *et al.*, *Kidney Int.* 67:1297, 2005) и при

нефропатии, индуцированной ангиотензином II (Knier et al., *J. Hypertens.* 29:1602, 2011; обзоры см. у Ma et al. *Frontiers Biosci.* 14:2028, 2009 и Eddy A.A. *Thromb. Haemost.* 101:656, 2009). В противоположность сказанному, у мышей со сверхэкспрессией PAI-1 проявляются более тяжелая степень фиброза и повышенное привлечение макрофагов после UUO (Matsuo et al., *Kidney Int.* 67: 2221, 2005; Bergheim et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:592, 2006). Было показано, что неингибирующий мутантный PAI-1 (PAI-1 R) защищает мышей от развития фиброза при экспериментальном гломерулонефрите (thy1) у крыс путем снижения экспрессии мочевого белка и накопления гломерулярного матрикса (Huang et al., *Kidney Int.* 70:515, 2006). Пептиды, блокирующие PAI-1, ингибируют накопление коллагена 3, 4 и фибронектина у мышей с UUO (Gonzalez et al., *Exp. Biol. Med.* 234:1511, 2009).

В течение последних 20 лет PAI-1, в качестве мишени при многочисленных патологиях, находился в центре внимания интенсивных исследований, касающихся ингибирования его активности или регуляции его экспрессии. Химические соединения (Suzuki et al., *Expert Opin. Investig. Drugs* 20:255, 2011), моноклональные антитела (Gils and Declerk, *Thromb Haemost*; 91:425, 2004), пептиды, мутантные формы (Cale and Lawrence, *Curr. Drug Targets* 8:971, 2007), siRNA или антисмысловые РНК были разработаны для ингибирования его различных функций или для регуляции его экспрессии. Однако, несмотря на интенсивные исследования проблему разработки терапевтически эффективного модулятора PAI-1 все еще предстоит решить. Соответственно, в данной области техники существует необходимость в новых средствах, ингибирующих активность PAI-1, для применения в лечении патологий человека, опосредованных PAI-1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РАСКРЫТИЯ

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:34), CDR2 (SEQ ID NO:33) и CDR3 (SEQ ID NO:32) из SEQ ID

NO:6, и переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:37), CDR2 (SEQ ID NO:36) и CDR3 (SEQ ID NO:35) из SEQ ID NO:7. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:6, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:7. В дополнительном аспекте переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:6, а переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:7. Все приблизительные значения % идентичности означают минимальный % идентичности; более высокие % идентичности, чем указанные значения, также охвачены настоящим раскрытием.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:34, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:36, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:6, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:7.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:22), CDR2 (SEQ ID NO:21) и CDR3 (SEQ ID NO:20) из SEQ ID NO:2, и переменную область легкой цепи, при этом указанная

вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:25), CDR2 (SEQ ID NO:24) и CDR3 (SEQ ID NO:23) из SEQ ID NO:3. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:2, а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:3. В дополнительном аспекте вариабельная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:2, а вариабельная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:3.

В дополнительном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:22, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:21, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:20; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:25, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:24, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:23. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:26, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:3.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:28), CDR2 (SEQ ID NO:27) и CDR3 (SEQ ID NO:26) из SEQ ID NO:4, и вариабельную область легкой цепи, при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:31), CDR2 (SEQ ID NO:30) и CDR3 (SEQ ID NO:29) из SEQ ID NO:5. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, а легкая цепь

содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:5. В дополнительном аспекте вариабельная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:4, а вариабельная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:5.

В дополнительном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:28, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:27, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:26; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:31, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:30, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:29. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:4, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:5.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:40), CDR2 (SEQ ID NO:39) и CDR3 (SEQ ID NO:38) из SEQ ID NO:8, и вариабельную область легкой цепи, при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:42) и CDR3 (SEQ ID NO:41) из SEQ ID NO:9. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:8, а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:9. В дополнительном аспекте вариабельная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:8, а вариабельная область легкой цепи

является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:9.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:40, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:39, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:38; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:43, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:42, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:41. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:8, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:9.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:52), CDR2 (SEQ ID NO:51) и CDR3 (SEQ ID NO:50) из SEQ ID NO:10, и переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:55), CDR2 (SEQ ID NO:54) и CDR3 (SEQ ID NO:53) из SEQ ID NO:11. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:10, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:11. В дополнительном аспекте переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:10, а переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:11.

В дополнительном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с

PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:52, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:51, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:50; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:55, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:54, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:53. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:10, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:11.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:58), CDR2 (SEQ ID NO:57) и CDR3 (SEQ ID NO:56) из SEQ ID NO:12, и переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:61), CDR2 (SEQ ID NO:60) и CDR3 (SEQ ID NO:59) из SEQ ID NO:13. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:12, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:13. В дополнительном аспекте переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO: 12, а переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:13.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:58, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:57, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:56; и (b) каркасные области легкой цепи,

CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:61, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:60, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:59. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:12, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:13.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:64), CDR2 (SEQ ID NO:63) и CDR3 (SEQ ID NO:62) из SEQ ID NO:14, и переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:67), CDR2 (SEQ ID NO:66) и CDR3 (SEQ ID NO:65) из SEQ ID NO:15. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:14, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:15. В дополнительном аспекте переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:14, а переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:15.

В дополнительном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:64, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:63, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:62; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:67, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:66, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:65. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи,

являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:14, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:15.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:70), CDR2 (SEQ ID NO:69) и CDR3 (SEQ ID NO:68) из SEQ ID NO:16, и переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:73), CDR2 (SEQ ID NO:72) и CDR3 (SEQ ID NO:71) из SEQ ID NO:17.

В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:16, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:17. В дополнительном аспекте переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:16, а переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:17.

В дополнительном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:70, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:69, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:68; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:73, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:72, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:71. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:16, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%

или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:17.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена человека 1 типа (PAI-1), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:46), CDR2 (SEQ ID NO:45) и CDR3 (SEQ ID NO:44) из SEQ ID NO:80, и переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:49), CDR2 (SEQ ID NO:48) и CDR3 (SEQ ID NO:47) из SEQ ID NO:81.

В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:80, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:81. В дополнительном аспекте переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:80, а переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:81.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:46, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:45, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:44; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:49, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:47. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO: 80, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO: 81.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ингибитором активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), где антитело

содержит переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:76), CDR2 (SEQ ID NO:75) и CDR3 (SEQ ID NO:74) из SEQ ID NO:18, и переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:79), CDR2 (SEQ ID NO:78) и CDR3 (SEQ ID NO:77) из SEQ ID NO:19. В дополнительном аспекте тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:18, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:19. В дополнительном аспекте переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:18, а переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной SEQ ID NO:19.

Выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:76, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:75, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:74; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:79, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:78, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:77. В определенных аспектах тяжелая цепь антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO: 18, а легкая цепь антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:19.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:146, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:145, и CDR3-область легкой

цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:147, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:36, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:147, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:145, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:146, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:145, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:34, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:145, и CDR3-область легкой

цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

В дополнительном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, связывающееся по сути с тем же эпитопом на PAI-1, что и выделенное моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO:34), CDR2 (SEQ ID NO:33) и CDR3 (SEQ ID NO:32) из SEQ ID NO:6, и переменную область легкой цепи, где переменная область легкой цепи содержит CDR1 (SEQ ID NO 37), CDR2 (SEQ ID NO:36) и CDR3 (SEQ ID NO:35) из SEQ ID NO:7.

В определенном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:76, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:75, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:74; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:79, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:78, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:77.

В одном аспекте в данном документе раскрыто гуманизованное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1 человека, где антитело содержит: (a) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:82, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:91, или ее антигенсвязывающий фрагмент; (b) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:83, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:92, или ее антигенсвязывающий фрагмент; (c) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:84, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:93, или ее антигенсвязывающий фрагмент; (d) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:85, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и

[illegible]

легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:93, или ее антигенсвязывающий фрагмент; или (n) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:89, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:95, или ее антигенсвязывающий фрагмент. В дополнительном аспекте гуманизованная переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной любой из раскрытых ранее переменных областей тяжелой цепи человека, а гуманизованная переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной любой из раскрытых ранее переменных областей легкой цепи человека.

В одном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее: (a) каркасную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:86, и (b) каркасную область легкой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:93. В определенных аспектах тяжелая цепь выделенного моноклонального антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:86, а легкая цепь выделенного моноклонального антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:93. В определенных других аспектах тяжелая цепь выделенного моноклонального антитела содержит каркасные области тяжелой цепи, являющиеся на 95% идентичными каркасным областям тяжелой цепи из SEQ ID NO:86, а легкая цепь выделенного моноклонального антитела содержит каркасные области легкой цепи, являющиеся на 95% идентичными каркасным областям из SEQ ID NO:93.

В другом аспекте в данном документе раскрыто гуманизованное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1 человека, где антитело содержит тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ

ID NO:154, или ее антигенсвязывающий фрагмент; и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:153, или ее антигенсвязывающий фрагмент. В другом аспекте в данном документе раскрыто гуманизованное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1 человека, где антитело содержит тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:155, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:153, или ее антигенсвязывающий фрагмент. В дополнительном аспекте гуманизованная переменная область тяжелой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной любой из раскрытых ранее переменных областей тяжелой цепи человека, а гуманизованная переменная область легкой цепи является на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичной любой из раскрытых ранее переменных областей легкой цепи человека.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, где антитело связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO:158. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело связывается с фрагментом полипептида, содержащим SEQ ID NO:158. В еще одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO:156 и/или SEQ ID NO:158. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:158 и/или SEQ ID NO:157. В еще одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, обладает сродством специфического связывания с остатками 160, 262, 296-297, 300-307 и/или 310-316 из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело, раскрытое в данном документе, взаимодействует по меньшей мере с остатками 311, 312 и 313 (D-Q-E) из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления PAI-1, связываемый антителом,

представляет собой PAI-1 человека. В других вариантах осуществления PAI-1, связываемый антителом, представляет собой активную форму PAI-1 человека.

В других вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, раскрытое в данном документе, связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO:161. В еще нескольких других вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO:159 и/или SEQ ID NO:161. В еще нескольких других вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:160 и/или SEQ ID NO:161. В еще одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, обладает сродством специфичного связывания с остатками 44-64 и/или остатками 307-321 из PAI-1 макака-крабоведа (SEQ ID NO:162). В определенных вариантах осуществления PAI-1, связываемый антителом, представляет собой PAI-1 макака-крабоведа. В других вариантах осуществления PAI-1, связываемый антителом, представляет собой неактивную форму PAI-1 макака-крабоведа.

В дополнительном аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, осуществляющее конкурентное ингибирование связывания любого из раскрытых антител с PAI-1. В варианте осуществления в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, конкурирующее за связывание с любым из выделенных моноклональных антител, раскрытых в данном документе, и/или осуществляющее конкурентное ингибирование их связывания. В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело конкурирует за связывание или осуществляет конкурентное ингибирование связывания с PAI-1 человека. В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело конкурирует за связывание или осуществляет конкурентное ингибирование связывания с полипептидом, содержащим SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:157 и/или SEQ ID NO:158. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело конкурирует за связывание или осуществляет конкурентное ингибирование связывания с полипептидом, содержащим SEQ ID NO:159, SEQ ID

NO:160 и/или SEQ ID NO:161. В варианте осуществления выделенное антитело конкурирует за связывание с полипептидом, содержащим SEQ ID NO:156, 157 и/или 158, с выделенным моноклональным антителом, содержащим (a) каркасные области тяжелой цепи, CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:34, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и (b) каркасные области легкой цепи, CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:145, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

В другом аспекте в данном документе раскрыты нуклеотиды, кодирующие любое из выделенных моноклональных антител, раскрытых в данном документе.

В одном аспекте в данном документе раскрыт способ лечения состояния, вызываемого повышенной экспрессией PAI-1 или повышенной чувствительностью к PAI-1, включающий введение пациенту или другому субъекту фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно.

В одном аспекте в данном документе раскрыт способ восстановления образования плазмينا, включающий введение пациенту или другому субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно. Парентеральное введение, раскрытое в данном документе, включает внутривенную, капельную, внутриартериальную, внутрибрюшинную, внутримышечную, подкожную, ректальную или вагинальную, внутривенную, внутриартериальную, подкожную и внутримышечную формы парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления введение пациенту или другому субъекту включает несколько введений. В другом аспекте способ восстановления образования плазмينا облегчает терапевтическое лечение состояния, включающего повышенные уровни фиброзной ткани. В некоторых аспектах состояние характеризуется фиброзом. В некоторых аспектах состояние представляет собой фиброз, фиброз кожи, системный склероз, фиброз легких, идиопатический легочный

фиброз, интерстициальное заболевание легких и хроническое заболевание легких. В других аспектах образование плазмина облегчает терапевтическое лечение фиброза печени, фиброза почек, в том числе хронического заболевания почек, тромбоза, венозного и артериального тромбоза, тромбоза глубоких вен, периферической ишемии конечностей, тромбоза по типу диссеминированного внутрисосудистого свертывания, острого ишемического инсульта, сопровождающегося и не сопровождающегося тромболизом, или рестеноза стента.

В другом аспекте в данном документе раскрыто применение фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 для производства лекарственного препарата для лечения состояния, вызываемого повышенной экспрессией PAI-1 или повышенной чувствительностью к PAI-1, предусматривающего введение пациенту или другому субъекту перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно.

В одном аспекте лекарственный препарат предназначен для лечения состояния, включающего повышенные уровни фиброзной ткани. В некоторых аспектах состояние характеризуется фиброзом. В некоторых аспектах состояние представляет собой фиброз, фиброз кожи, системный склероз, фиброз легких, идиопатический легочный фиброз, интерстициальное заболевание легких и хроническое заболевание легких. В других аспектах лекарственный препарат предназначен для лечения состояния, включающего фиброз печени, фиброз почек, в том числе хроническое заболевание почек, тромбоз, венозный и артериальный тромбоз, тромбоз глубоких вен, периферическую ишемию конечностей, тромбоз по типу диссеминированного внутрисосудистого свертывания, острый ишемический инсульт, сопровождающийся и не сопровождающийся тромболизом, или рестеноз стента.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, где антитело подавляет фиброз легких. В определенных вариантах осуществления антитело подавляет фиброз в легком субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело подавляет фиброз в легком субъекта с идиопатическим легочным фиброзом (IPF). В

некоторых вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело, раскрытое в данном документе, вызывает усиление распада фибрина у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело усиливает распад фибрина в плазме крови субъекта. В некоторых других вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело, раскрытое в данном документе, ингибирует накопление коллагена в легком субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет IPF. В некоторых других вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело, раскрытое в данном документе, повышает уровни D-димера в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет IPF. В некоторых других вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело, раскрытое в данном документе, специфически связывается с PAI-1, где антитело ингибирует увеличение массы легкого в связи с фиброзом у субъекта. В одном варианте осуществления субъект имеет IPF.

В другом аспекте в данном документе раскрыто применение фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 для производства лекарственного препарата для лечения состояния, вызываемого повышенной экспрессией PAI-1 или повышенной чувствительностью к PAI-1, предусматривающего введение пациенту перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно, где состояние представляет собой идиопатический легочный фиброз.

В другом аспекте в данном документе раскрыт способ восстановления образования плазмينا, включающий введение пациенту или другому субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно, где образование плазмина облегчает терапевтическое лечение идиопатического легочного фиброза.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, где антитело восстанавливает фибринолитическую активность у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело

восстанавливает фибринолитическую активность у субъекта с острым ишемическим инсультом. Острый ишемический инсульт может сопровождаться или не сопровождаться тромболизом. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело восстанавливает лизис сгустков. В определенных вариантах осуществления антитело восстанавливает лизис сгустков *in vitro*. В еще нескольких других вариантах осуществления антитело восстанавливает лизис сгустков *in vitro* при IC₅₀, составляющей приблизительно 2 нМ.

В других аспектах в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, где антитело восстанавливает разрушение фибрина у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет острый ишемический инсульт.

В другом аспекте в данном документе раскрыто применение фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 для производства лекарственного препарата для лечения состояния, вызываемого повышенной экспрессией PAI-1 или повышенной чувствительностью к PAI-1, предусматривающего введение пациенту перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно, где состояние представляет собой острый ишемический инсульт, сопровождающийся и не сопровождающийся тромболизом.

В другом аспекте в данном документе раскрыт способ восстановления образования плазмينا, включающий введение пациенту или другому субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно, где образование плазмина облегчает терапевтическое лечение острого ишемического инсульта, сопровождающегося и не сопровождающегося тромболизом.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, где антитело ингибирует образование спаек у субъекта. В некоторых вариантах осуществления образование спаек происходит после хирургического вмешательства или повреждения у субъекта. В

некоторых вариантах осуществления образование спаек у субъекта происходит в брюшной полости. В других вариантах осуществления образование спаек происходит в области плеча, таза, сердца, позвоночника, кисти руки и других участках тела субъекта.

В другом аспекте в данном документе раскрыто применение фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 для производства лекарственного препарата для лечения или предупреждения состояния, вызываемого повышенной экспрессией PAI-1 или повышенной чувствительностью к PAI-1, предусматривающего введение пациенту перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно, где состояние представляет собой образование спаек в брюшной полости.

В другом аспекте в данном документе раскрыт способ восстановления образования плазмينا, включающий введение пациенту или другому субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно, где образование плазмина облегчает терапевтическое лечение или предупреждение образования спаек. В некоторых вариантах осуществления образование спаек у субъекта происходит в брюшной полости.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, связывающееся с комплексом PAI-1/витронектин. В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, которое нейтрализует активность PAI-1, вызывая образование субстратной конформации PAI-1. В варианте осуществления антитело восстанавливает или способно восстанавливать образование плазмينا. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело вызывает или способно вызывать распад фибронектина. В еще одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело вызывает или способно вызывать активацию матриксных металлопротеиназ (ММР).

В другом аспекте выделенное моноклональное антитело, раскрытое в данном документе, представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело

представляет собой антитело на основе одноцепочечного Fv. В других вариантах осуществления тяжелая цепь и легкая цепь соединены гибким линкером с образованием одноцепочечного антитела. В других вариантах осуществления антитело представляет собой антитело на основе Fab, Fab' или (Fab')₂.

В другом аспекте в данном документе раскрыто выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, где антитело представляет собой кристаллизованное антитело. В варианте осуществления в данном документе раскрыт выделенный кристалл, содержащий Fab'-фрагмент моноклонального антитела A44, где Fab'-фрагмент состоит из последовательности легкой цепи SEQ ID NO:7 и последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO:6. В другом варианте осуществления в данном документе раскрыт выделенный кристалл, содержащий Fab'-фрагмент, содержащий последовательность легкой цепи SEQ ID NO:93 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:86. В варианте осуществления выделенный кристалл имеет следующие размеры асимметричной элементарной ячейки: $a=105 \text{ \AA}$, $b=152 \text{ \AA}$ и $c=298 \text{ \AA}$. В варианте осуществления выделенный кристалл принадлежит к пространственной группе P212121. В другом варианте осуществления выделенный кристалл характеризуется разрешением при рентгеновской дифракции, составляющим $3,3 \text{ \AA}$. В варианте осуществления выделенный кристалл сохраняет биологическую активность кристаллизованного антитела. В некоторых вариантах осуществления выделенный кристалл имеет больший период полувыведения *in vivo*, чем растворимый аналог кристаллизованного антитела.

В одном аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая: (a) кристаллизованное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, и (b) по меньшей мере один фармацевтический наполнитель, в который погружен или в котором инкапсулирован кристалл.

В другом аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество любого из антител, раскрытых в данном документе.

В одном аспекте в данном документе раскрыт способ получения антитела к PAI-1, включающий иммунизацию млекопитающего комплексом, состоящим из PAI-1 или его фрагмента и витронектина.

В другом аспекте в данном документе раскрыт способ скрининга антитела к PAI-1 в ELISA в отношении его способности к блокированию функции PAI-1 в качестве ингибитора активности tPA, включающий стадии: (a) связывания PAI-1 на планшете для ELISA; (b) инкубирование планшета для ELISA с антителом к PAI-1; (c) инкубирование планшета для ELISA с tPA; (d) инкубирование планшета для ELISA с меченым антителом к tPA и (e) измерение OD₄₀₅ по испусканию меченым антителом к tPA; где положительная регистрируемая величина означает, что антитело к PAI-1 связывается с PAI-1, но не блокирует образование ковалентной связи между PAI-1 и tPA, а отрицательная регистрируемая величина означает, что антитело к PAI-1 блокирует взаимодействие PAI-1 с tPA.

В другом аспекте в данном документе раскрыт способ скрининга гибридом. В определенных вариантах осуществления способ скрининга включает способ обратного скрининга с использованием иммобилизованных антител к PAI-1 мыши. В других вариантах осуществления способ скрининга включает прямой скрининговый анализ с использованием свободного PAI-1 в качестве лиганда или на иммобилизованном витронектине. В определенных вариантах осуществления способ применяют для определения сродства антитела к комплексу PAI-1/витронектин. В некоторых вариантах осуществления способ включает иммобилизацию витронектина на поверхности; приведение PAI-1 в контакт с витронектином, иммобилизованным на поверхности, с образованием, таким образом, комплекса; приведение поверхности, содержащей комплекс, в контакт с антителом; отделение антитела, связанного с комплексом, от несвязанного антитела; обнаружение антитела, связанного с комплексом, и анализ уровней антитела, связанного с комплексом, для определения сродства антитела к комплексу.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 показано схематическое изображение механизмов взаимодействия между PAI-1 и серин-протеазным тканевым

активатором плазминогена (tPA) и урокиназным активатором плазминогена (uPA). PAI-1 проявляет структурную гибкость и может встречаться в неактивной конформации или активной конформации, будучи связанным с витронектином (Vn). Область RCL PAI-1 содержит "приманочную" пептидную связь (также называемую P1-P1'), которая представляет собой участок расщепления для сериновой протеазы. Вначале образуется комплекс Михаэлиса с tPA или uPA, затем каталитическая триада реагирует с "приманочной" пептидной связью с образованием комплекса ацилфермента, который после расщепления пептидной связи P1-P'1 вызывает существенные конформационные изменения. Ацилфермент представляет собой нестабильный комплекс, образованный ковалентной связью между сериновым остатком (черный треугольник) из каталитической триады сериновой протеазы (tPA) и аминокислотой субстрата (черный круг), который подвергается дальнейшему гидролизу. Конформационные изменения обуславливают вставку расщепленной RCL в β -нить, при этом протеаза остается ковалентно связанной с PAI-1 в качестве ацилфермента. В нефизиологических условиях гидролиз данного комплекса ацилфермента может вызывать высвобождение расщепленного PAI-1 и свободной активной протеазы.

На фигуре 2 показана типичная калибровочная кривая для титрования антитела в анализе связывания ELISA, описанном в примере 2. Антитела 31C9, 33B8 и 33H1 являлись положительными контролями, а IgG1 являлся отрицательным контролем.

На фигуре 3 показана иллюстративная кривая в функциональном ELISA для отбора антител, блокирующих взаимодействие PAI-1 с tPA, описанном в примере 4. Антитело 33H1 является положительным контролем, IgG1 является отрицательным контролем, а A44 был идентифицирован как положительный клон антитела.

На фигуре 4 показана нейтрализация блокирующей активности PAI-1 человека в отношении tPA с помощью A44 и коммерчески доступных антител (33B8 и 33H1) в хромогенном анализе, описанном в примере 4.

На фигуре 5 показана нейтрализация блокирующей активности PAI-1 человека в отношении tPA путем отбора антител, полученных

из различных продуктов слияния (см. пример 4).

На фигуре 6 показаны PAI-1 человека и его ортологи, блокирующие активность tPA человека в хромогенном анализе со сходной эффективностью.

На фигуре 7 показана нейтрализация блокирующей активности PAI-1 макака-крабоеда (яванского макака) и мыши в отношении tPA человека с помощью антител A44 и 33B8 (коммерчески доступных) в хромогенном анализе, описанном в примере 4.

На фигуре 8 показан анализ SDS-PAGE механизма действия антител 33H8 (превращает PAI-1 из активной в неактивную конформацию), 33H1 (превращает PAI-1 из активной в субстратную конформацию) и A44, блокирующих взаимодействие PAI-1 с tPA. Дорожка 1: стандарты молекулярной массы; дорожка 2: только PAI-1; дорожка 3: только tPA; дорожка 4: PAI-1 в присутствии tPA; дорожка 5: 33B8+PAI-1+tPA; дорожка 6: 33H1+PAI-1+tPA; дорожка 7: A44+PAI-1+tPA; дорожка 8: mAb представляет собой антитело изотипического контроля.

На фигуре 9 показан анализ SDS-PAGE механизма действия антител 33H8 (превращает PAI-1 из активной в неактивную конформацию), 33H1 (превращает PAI-1 из активной в субстратную конформацию) и антител, вырабатываемых продуктами слияния C26, E16 и E21, блокирующих взаимодействие PAI-1 с tPA. Дорожка 1: стандарты молекулярной массы; дорожка 2: только PAI-1; дорожка 3: только tPA; дорожка 4: PAI-1 в присутствии tPA; дорожка 5: 33B8+PAI-1+tPA; дорожка 6: 33H1+PAI-1+tPA; дорожка 7: C26+PAI-1+tPA; дорожка 8: E16+PAI-1+tPA; дорожка 9: E21+PAI-1+tPA; дорожка 10: mAb представляет собой антитело изотипического контроля.

На фигуре 10 показан анализ SDS-PAGE механизма действия антител 33H8 (превращает PAI-1 из активной в неактивную конформацию), 33H1 (превращает PAI-1 из активной в субстратную конформацию) и антител, вырабатываемых продуктами слияния A39, B109 и C45, блокирующих взаимодействие PAI-1 с tPA. Дорожка 1: стандарты молекулярной массы; дорожка 2: только PAI-1; дорожка 3: только tPA; дорожка 4: PAI-1 в присутствии tPA; дорожка 5: 33B8+PAI-1+tPA; дорожка 6: 33H1+PAI-1+tPA; дорожка 7: A39+PAI-

1+tPA; дорожка 8: B109+PAI-1+tPA; дорожка 9: C45+PAI-1+tPA; дорожка 10: mAb представляет собой антитело изотипического контроля.

На фигуре 11 показано выравнивание легких цепей следующих антител мыши: A105 (SEQ ID NO:3), A39 (SEQ ID NO:5), A44 (SEQ ID NO:7), A71 (SEQ ID NO:9), A75 (SEQ ID NO:81), B109 (SEQ ID NO:11), B28 (SEQ ID NO:13), C45 (SEQ ID NO:15), E16 (SEQ ID NO:17) и E21 (SEQ ID NO:19). CDR выделены жирным шрифтом.

На фигуре 12 показано выравнивание тяжелых цепей следующих антител мыши: A105 (SEQ ID NO:2), A39 (SEQ ID NO:4), A44 (SEQ ID NO:6), A71 (SEQ ID NO:8), A75 (SEQ ID NO:80), B109 (SEQ ID NO:10), B28 (SEQ ID NO:12), C45 (SEQ ID NO: 4), E16 (SEQ ID NO:16) и E21 (SEQ ID NO:18). CDR, определенные в IMGT, выделены жирным шрифтом.

На фигуре 13 показано выравнивание легкой цепи A44 мыши (SEQ ID NO:7) с vk1 (SEQ ID NO:101) и ν -лямбда-3 (SEQ ID NO:102).

На фигуре 14 показано выравнивание тяжелой цепи A44 мыши (SEQ ID NO:6) с vh2 (SEQ ID NO:103) и vh4 (SEQ ID NO:104).

На фигуре 15 показаны гуманизированные VL клона A44 с выравниванием всех конструкций. Все выровненные последовательности (SEQ ID NO:91-98) дополнительно описаны ниже в таблице 25. В черных рамках представлены CDR-домены. Выделенные остатки отличаются в последовательности от остатка, расположенного непосредственно выше в выравнивании. Нумерация остатков соответствует описанной в IMGT.

На фигуре 16 показаны гуманизированные VH клона A44 с выравниванием всех конструкций. Все выровненные последовательности (SEQ ID NO:82-90) дополнительно описаны ниже в таблице 25. В черных рамках представлены CDR-домены. Выделенные остатки отличаются в последовательности от остатка, расположенного непосредственно выше в выравнивании. Нумерация остатков соответствует описанной в IMGT.

На фигуре 17 показано процентное значение ингибирования активности PAI-1, отложенное на графике в зависимости от концентрации mAb, а также IC50 и Imax, определенные с помощью

быстродействующего программного обеспечения Biostat.

На фигуре 18 показана очистка однородного рекомбинантного Fab A44, меченного 6-His.

На фигуре 19 показан SPR-анализ с помощью Biacore 2000 с использованием однократного кинетического анализа связывания гликозилированного PAI-1 человека с иммобилизованным антителом APG. Сенсограмма одноциклового кинетического анализа показана серым цветом. Подобранная модель показана черным цветом.

На фигуре 20 показана нейтрализация PAI-1 в плазме крови человека с помощью антител APG, APGv2 и APGv4, определенная путем обнаружения образования комплекса UK-PAI-1 посредством ELISA. Процентное значение ингибирования активности PAI-1 откладывали на графике в зависимости от концентрации антител APG, APGv2 или APGv4.

На фигуре 21 показано восстановление лизиса стустков плазмы крови человека с помощью A44V11 (1, 3 или 10 нМ) в присутствии 1 нМ tPA и 3 нМ PAI-1, обнаруживаемое с помощью турбидиметрического кинетического измерения по показаниям поглощения при 340 нм, в зависимости от времени (мин.).

На фигуре 22 показано отсутствие восстановления лизиса стустков плазмы крови человека с помощью IgG1 человека в качестве отрицательного контроля (1, 3 или 10 нМ) в присутствии 1 нМ tPA и 3 нМ PAI-1, обнаруживаемое с помощью поглощения при 340 нм, в зависимости от времени (мин.).

На фигуре 23 показано восстановление лизиса стустков плазмы крови человека с помощью A44V11 или IgG1 человека в качестве отрицательного изотипического контроля в различных концентрациях.

На фигуре 24 показано восстановление лизиса стустков плазмы крови человека с помощью APG, APGV2 или APGV4 при 3 нМ в присутствии 1 нМ tPA и 3 нМ PAI-1, обнаруживаемое с помощью поглощения при 340 нм, в зависимости от времени (мин.).

На фигуре 25 показано восстановление лизиса стустков плазмы крови человека с помощью вариантов 2 и 4 APG в различных концентрациях.

На фигуре 26 показан иммуноблоттинг антител к PAI-1 в

образцах надосадочной жидкости культуры миофибробластов человека LL29 через 48 ч. после обработки mAb A44V11 или изотипическим контролем IgG при 50 нМ и 5 нг/мл TGF β .

На фигуре 27 показана общая активность MMP в первичных фибробластах легких человека после обработки клеток в течение 48 ч. с помощью PBS (контроль), плазминогена (Pg), A44v11 и плазминогена (A+Pg) или IgG человека в качестве отрицательного контроля и плазминогена (отриц.+Pg).

На фигуре 28 показан уровень активного PAI-1 человека в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) (A) и в лизате легкого (B) у мышей, обработанных блеомицином, в день 7 и день 9 после обработки в день 4 с помощью A44 или IgG1 при 10 мг/кг или PBS посредством i.p. введения. Уровень активного PAI-1 определяли с помощью ELISA (№ HPAIKT, Molecular Innovation). Процентное значение ингибирования рассчитывали путем деления разности между A44-блеомицин и IgG-блеомицин на разность между IgG-блеомицин и необработанной (PBS) группой мышей.

На фигуре 29 показан уровень D-димера мышей в BALF, обработанных блеомицином, в день 7 и день 9 после обработки в день 4 с помощью A44 или IgG1 при 10 мг/кг или PBS посредством i.p. введения, определенный с помощью ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago). Указана кратность увеличения уровня D-димера, вызываемого A44, по сравнению с IgG.

На фигуре 30 показана масса правого легкого у трансгенных гуманизированных мышей через 21 день после обработки физиологическим раствором или блеомицином, а затем PBS (инертное вещество), IgG1 или A44 при 10 мг/кг путем i.p. введения от дня 4 до дня 20 каждые 3 дня.

На фигуре 31 показано содержание гидроксипролина в легком у трансгенных гуманизированных мышей через 21 день после обработки физиологическим раствором или блеомицином, а затем PBS (инертное вещество), IgG1 или A44 при 10 мг/кг путем i.p. введения от дня 4 до дня 20 каждые 3 дня.

На фигуре 32 показан уровень активного PAI-1 в плазме крови обезьян, обработанных mAb A44V11 (A) (n=5) или IgG1 в качестве

изотипического контроля (B) (n=4) (5 мг/кг i.p.) за 24 часа до стимуляции с помощью LPS (100 мкг/кг i.v). Образцы крови собирали в указанный момент времени, и с помощью ELISA (№ НРАИКТ от Molecular Innovation) определяли уровни активного PAI-1 в плазме крови.

На фигуре 33 показан уровень активного PAI-1 в биоптатах печени обезьян, обработанных mAb A44V11 (A) (n=5) или IgG1 в качестве изотипического контроля (B) (n=4) (5 мг/кг i.p.) за 24 часа до стимуляции с помощью LPS (100 мкг/кг i.v). Биоптаты печени собирали у анестезированных обезьян в указанный момент времени, и с помощью ELISA (№ НРАИКТ от Molecular Innovation) определяли уровни активного PAI-1 в лизатах.

На фигуре 34 показан уровень D-димера в плазме крови обезьян, обработанных mAb A44V11 (A) (n=5) или IgG1 в качестве изотипического контроля (B) (n=4) (5 мг/кг i.p.) за 24 часа до стимуляции с помощью LPS (100 мкг/кг i.v). Образцы крови собирали в указанный момент времени, и с помощью ELISA определяли уровни D-димера в плазме крови.

На фигуре 35 показан уровень комплексов плазмин- α 2-антиплазмин (PAP) в плазме крови обезьян, обработанных mAb A44V11 (A) (n=5) или IgG1 в качестве изотипического контроля (B) (n=4) (5 мг/кг i.p.) за 24 часа до стимуляции с помощью LPS (100 мкг/кг i.v). Образцы крови собирали в указанный момент времени, и с помощью ELISA (№ Asserachrom PAP от Diagnostica Stago) определяли уровни PAP в плазме крови.

На фигуре 36 показан уровень активного PAI-1 во внутрибрюшной жидкости (IPF) и лизатах рога матки. Уровни активного PAI-1 во внутрибрюшной жидкости (A) и лизатах рога матки (B). В моменты времени 6 часов и день 7 уровни активного PAI-1 как во внутрибрюшной жидкости (IPF), так и в лизатах рога матки (UH) у животных, обработанных антителом A44V11, были более низкими по сравнению с животными, обработанными антителом изотипического контроля, при этом в момент времени 72 часа разница не наблюдалась. (* $p < 0,001$, рассчитано по Т-критерию Стьюдента)

На фигуре 37 показан еще один пример очистки однородного

рекомбинантного Fab A44, меченного 6-His.

На фигуре 38 показана очистка однородного рекомбинантного Fab A44, меченного 6-His, в комплексе с белком PAI-1 человека wt.

На фигуре 39 (a) показана кристаллизация комплекса для комплекса Fab A44/PAI-1, а на фигуре 39 (b) показаны лучшие оптимизированные кристаллы.

На фигуре 40 показаны отдельные стержневидные кристаллы комплекса Fab A44/PAI-1.

На фигуре 41 показан Fab A44, распознающий активную форму PAI-1 человека и неактивную форму PAI-1 макака-крабоеда.

На фигуре 42 показан эпитоп PAI-1, распознаваемый Fab A44, в (A) активном PAI-1 человека и (B) неактивном PAI-1 макака-крабоеда.

На фигуре 43 показана часть тяжелой цепи, образующая паратоп, комплекса Fab A44/PAI-1.

На фигуре 44 показана часть легкой цепи, образующая паратоп, комплекса Fab A44/PAI-1.

На фигуре 45 показано выравнивание последовательностей предполагаемых эпитопов PAI-1 макака-крабоеда, человека, крысы и мыши, связываемых A44. Последовательности выписаны из SEQ ID NO:1 (PAI-1 человека), SEQ ID NO:162 (PAI-1 макака-крабоеда), SEQ ID NO:163 (PAI-1 мыши) и SEQ ID NO:164 (PAI-1 крысы).

На фигуре 46 показано сравнение структуры PAI-1 мыши со структурой комплекса PAI-1/A44V11 человека.

На фигуре 47 показана структура комплекса PAI-1/A44V11 человека и модель связывания вибронектина с PAI-1.

На фигуре 48 показан охват получаемых под воздействием пепсина пептидов PAI-1 макака-крабоеда (SEQ ID NO:162); 95,3% охват последовательностей получен по 150 перекрывающимся получаемым под воздействием пепсина пептидам.

На фигуре 49 показаны иллюстративные диаграммы поглощения дейтерия для пептидов PAI-1 макака-крабоеда в несвязанном (линии с кружками), связанном с APGv2 (линии с крестиками) и связанном с A44v11 (линии с ромбиками) состояниях. Диапазоны/положения остатков взяты из SEQ ID NO:162. (A) Для большинства получаемых

под воздействием пепсина пептидов не была показана разница между PAI-1 макака-крабоеда самим по себе и связанным с каким-либо mAb. (B) Пептиды, охватывающие остатки 44-64, продемонстрировали сходную защищенность от обмена в обоих состояниях связанности с mAb. (C) Пептиды, включающие в своем составе остатки 295-322, включают меньше дейтерия в обоих состояниях связанности с mAb, хотя величина защищенности является большей для A44v11.

На фигуре 50 показано сравнение PAI-1 макака-крабоеда самого по себе и связанного с A44v11 по методу водородно-дейтериевого обмена (HDX). (A) Диаграмма "бабочек" для среднего относительного частичного обмена, при этом несвязанное состояние показано сверху, а связанное состояние показано внизу. Линии соответствуют данным, полученным для моментов времени 10 с, 1 мин., 5 мин. и 240 мин. На (B) представлена диаграмма с данными о разнице (в дальтонах) из вышеприведенной диаграммы на (A) в отношении PAI-1 макака-крабоеда самого по себе или связанного с A44v11.

На фигуре 51 показано сравнение PAI-1 макака-крабоеда самого по себе и связанного с APGv2 по методу HDX. На (A) представлена диаграмма "бабочек" для среднего относительного частичного обмена, при этом несвязанное состояние показано сверху, а связанное состояние показано внизу. Линии соответствуют данным, полученным для моментов времени 10 с, 1 мин., 5 мин. и 240 мин. На (B) представлена диаграмма с данными о разнице из вышеприведенной панели (A) в отношении PAI-1 макака-крабоеда самого по себе или связанного с APGv2.

На фигуре 52 показано сравнение PAI-1 макака-крабоеда, связанного с A44v11 и связанного с APGv2, по методу HDX. На (A) представлена диаграмма "бабочек" для среднего относительного частичного обмена, при этом состояние связанности с APGv2 показано сверху, а состояние связанности с A44v11 показано внизу. Линии соответствуют данным, полученным для моментов времени 10 с, 1 мин., 5 мин. и 240 мин. На (B) представлена диаграмма с данными о разнице из вышеприведенной панели (A) в отношении PAI-1 макака-крабоеда, связанного с APGv2 или связанного с A44v11.

На фигуре 53 показан эпитоп PAI-1 макака-крабоеда:A44v11, определенный с помощью HDX-MS. Остатки PAI-1 макака-крабоеда (SEQ ID NO:162), демонстрирующие защищенность от обмена в состоянии связанности с антителом A44v11, показаны жирным шрифтом. Остатки эпитопа PAI-1 макака-крабоеда:A44v11, определенные в исследованиях кристаллизации, показаны в рамках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем изобретении представлены антитела и их фрагменты, специфически связывающиеся с PAI-1 человека и модулирующие биологические функции PAI-1. Такие антитела особенно применимы для лечения заболеваний или нарушений, ассоциированных с PAI-1 (например, фиброза). В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела к PAI-1, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител или их фрагментов. Способы применения антител, раскрытых в данном документе, для обнаружения PAI-1 или для модулирования активности PAI-1 *in vitro* или *in vivo* также охвачены настоящим изобретением.

I. Определения

Для того, чтобы настоящее изобретение можно было легче понять, вначале определены некоторые термины.

Применяемый в данном документе термин "PAI-1 человека" относится к пептиду, содержащему аминокислотную последовательность, приведенную ниже:

VNHPPSYVAHNLASDFGVRVFFQQAQASKDRNVVFSYPGVASVLAMLQLTTGGETQQQIQ
AAMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMPHFFRLFRSTVKQ
VDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISNLLGKGAVDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRR
LFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYTEFTTPDGHYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEVPLSALT
NILSAQLISHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQEPL
HVAQALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIMDRPFLFVVRHNPTGTVLFMGQVMEP
(SEQ ID NO. 1), или ее фрагмент, или состоящему из них.

Применяемый в данном документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимерам

(например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно V_H или VH) и константную область тяжелой цепи (C_H или CH). Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно V_L или VL) и константную область легкой цепи (C_L или CL). Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Применяемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела включает любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или получаемый методами генной инженерии полипептид или гликопротеин, специфически связывающийся с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут происходить, например, из целых молекул антител с помощью любых подходящих стандартных технологий, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, включающих манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антител, и ее экспрессию. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих частей включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) $F(ab')_2$ -фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR)). Другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела и миниантитела, также охвачены выражением "антигенсвязывающий фрагмент".

Применяемый в данном документе термин "CDR" или "область, определяющая комплементарность" означает несмежные антигенсвязывающие центры находящиеся в переменной области как

тяжелой, так и легкой полипептидной цепи. Эти конкретные области были описаны в Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977), и в Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest.* (1991), и в Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), и в MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывание или подмножества аминокислотных остатков при сравнении между собой. Определение по Kabat основано на вариабельности последовательностей. Уникальная нумерация по IMGT для всех V-областей IG и TR всех молекул обусловлена высокой консервативностью структуры вариабельной области (Lefranc, Mр et al., *Dev Comp. Immunol.* 27:55-77, 2003). Нумерация по IMGT, установленная после выравнивания более чем 5000 последовательностей, учитывает и сочетает определение каркасных областей и CDR. Определение по Chothia основано на местоположении областей структурных петель. Контактное определение (MacCallum et al.) основано на анализе сложных кристаллических структур и взаимодействий антитела и антигена. Аминокислотные остатки, охватываемые CDR, определенным в любом из вышеупомянутых литературных источников, приведены для сравнения. В одном варианте осуществления, раскрытом в данном документе, термин "CDR" означает CDR, определенный согласно определению по Kabat. В другом варианте осуществления, раскрытом в данном документе, CDR представляет собой CDR, определенный по IMGT.

Применяемый в данном документе термин "аминокислотные остатки каркасной области (FR)" относится к таким аминокислотам в каркасной области цепи Ig. Термин "каркасная область" или "FR-область", применяемый в данном документе, включает аминокислотные остатки, являющиеся частью вариабельной области, но не являющиеся частью CDR (например, по контактному определению CDR). Таким образом, каркасная область в вариабельной области имеет длину приблизительно 100-120 аминокислот, но содержит только те аминокислоты, которые находятся за пределами CDR.

Настоящее изобретение также охватывает "консервативные аминокислотные замены" в аминокислотных последовательностях CDR

антител, раскрытых в данном документе, т.е. модификации аминокислотных последовательностей, которые не приводят к прекращению связывания антитела с антигеном, т.е. PAI-1. Консервативная замена представляет собой такую замену нативного аминокислотного остатка на ненативный остаток, что эффект в отношении полярности или заряда аминокислотного остатка в этом положении является незначительным или отсутствует. Например, консервативная замена происходит в результате замещения неполярного остатка в полипептиде любым другим неполярным остатком. Кроме того, любой нативный остаток в полипептиде также может быть заменен аланином, как было ранее описано для "аланин-сканирующего мутагенеза" (Cunningham *et al.*, *Science* 244:1081-85 (1989)). Консервативные аминокислотные замены включают в себя замену аминокислоты из одного класса аминокислотой из того же класса, где класс определяется общими физико-химическими свойствами боковых цепей аминокислот и высокими частотами замен в гомологичных белках, обнаруживаемыми в природе, определенными, например, с помощью стандартной матрицы частот обмена Дайхофф или матрицы BLOSUM. Аминокислоты были распределены по шести общим классам боковых цепей, которые включают: класс I (Cys); класс II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); класс III (Asn, Asp, Gln, Glu); класс IV (His, Arg, Lys); класс V (Ile, Leu, Val, Met) и класс VI (Phe, Tyr, Trp). Например, замена на Asp другого остатка класса III, такого как Asn, Gln или Glu, является консервативной заменой. Таким образом, предсказанный несущественный аминокислотный остаток в антителе к PAI-1 замещают другим аминокислотным остатком из того же класса. Способы идентификации консервативных аминокислотных замен, не устраняющих связывание с антигеном, хорошо известны из уровня техники (см., например, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180, 1993; Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12:879, 1999; и Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412, 1997). Общие правила для консервативных аминокислотных замен приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1

Консервативные аминокислотные замены

Исходные остатки	Иллюстративные замены	Выбранные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Консервативные аминокислотные замены также охватывают не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, обычно включаемые путем химического синтеза пептидов, а не путем синтеза в биологических системах. Они включают в себя пептидомиметики, а также другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных фрагментов.

Предполагается, что консервативные модификации

аминокислотной последовательности (и соответствующие модификации кодирующих нуклеотидов) обуславливают получение антител к PAI-1, имеющих функциональные и химические характеристики, аналогичные таковым у встречающихся в природе антител к PAI-1. В отличие от этого, существенные модификации функциональных или химических характеристик антител к PAI-1 можно выполнить путем выбора замен, которые значительно отличаются по своему эффекту в отношении сохранения (а) структуры молекулярного остова в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом участке или (c) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки можно подразделить на группы на основании общих свойств боковой цепи:

- 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr;
- 3) кислые: Asp, Glu;
- 4) основные: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены могут включать обмен члена одного из этих классов на члена другого класса. Такие заменяемые остатки могут быть введены в области антитела человека к PAI-1, гомологичные отличному от человеческого антителу к PAI-1, или в негомологичные области молекулы.

В определенных аспектах переменные области тяжелой или легкой цепи могут быть на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичными любой из последовательностей переменных областей, раскрытых в данном документе.

Применяемый в данном документе термин "специфически связывается с" относится к способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к связыванию с антигеном при K_d ниже 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М или менее. Данный термин также охватывает ссылку на способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к связыванию с антигеном со сродством, по меньшей мере в два раза

превышающим его сродство к неспецифическому антигену.

В настоящем раскрытии также представлены антитела, осуществляющие конкурентное ингибирование связывания антитела с эпитопом, раскрытым в данном документе, определенное с помощью любого способа определения конкурентного связывания, известного из уровня техники, например, иммунологических анализов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитело осуществляет конкурентное ингибирование связывания с эпитопом по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 50%.

Применяемый в данном документе термин "антиген" относится к участку связывания или эпитопу, распознаваемому антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Подразумевается, что применяемый в данном документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к переносу другой нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухнитевой петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где в вирусный геном могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы для млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы для млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и реплицируются, таким образом, вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). Как правило, векторы экспрессии, полезные в технологиях рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. Термины "плазмида" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо. Однако, подразумевается, что

настоящее изобретение включает и другие такие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы, дефектные по репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющие эквивалентные функции.

Для целей настоящего изобретения можно использовать многочисленные векторные системы экспрессии. Например, в одном классе векторов используются элементы ДНК, происходящие из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. В других предусматривается применение полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. Дополнительно, клетки с интегрированной ДНК в их хромосомах можно подвергать отбору путем введения одного или нескольких маркеров, позволяющих проводить отбор трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечивать прототрофность ауксотрофному хозяину, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Селектируемый маркерный ген может быть непосредственно связан с последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, либо введен в ту же клетку путем котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК также могут быть необходимы дополнительные элементы. Эти элементы могут включать в себя сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также транскрипционные промоторы, энхансеры и сигналы терминации. В конкретных вариантах осуществления клонированные гены переменных областей встраивают в вектор экспрессии вместе с генами константных областей тяжелой и легкой цепи (например, человека) путем синтеза, как обсуждается выше.

В более общем смысле, после того, как вектор или последовательность ДНК, кодирующая антитело или его фрагмент, были получены, вектор экспрессии можно вводить в подходящую клетку-хозяина. Иными словами, клетки-хозяева можно трансформировать. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно выполнить с помощью различных технологий, хорошо известных специалистам в данной области. Они включают, без ограничения, трансфекцию (в том числе электрофорез и электропорацию), слияние

протопластов, осаждение фосфатом кальция, слияние клеток с ДНК в оболочке, микроинъекцию и инфицирование интактным вирусом. См. Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472, Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Вариант осуществления, раскрытый в данном документе, представляет собой введение плазмиды в хозяина путем электропорации. Трансформированные клетки выращивают в условиях, подходящих для выработки легких цепей и тяжелых цепей, и анализируют в отношении синтеза тяжелых или легких цепей белка. Иллюстративные аналитические технологии включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) или анализ на клеточном сортере с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимический анализ и т.п.

Применяемый в данном документе термин "трансформация" следует употреблять в широком смысле для обозначения введения ДНК в реципиентную клетку-хозяина, которое изменяет генотип и вследствие этого приводит к изменению в реципиентной клетке.

"Клетки-хозяева" относятся к клеткам, которые были трансформированы векторами, сконструированными с использованием технологий рекомбинантных ДНК и кодирующими по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях способов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" применяются взаимозаменяемо для обозначения источника антитела, если четко не определено иное. Иными словами, выделение полипептида из "клеток" может означать выделение из целых клеток, осажденных центрифугированием, или из культуры клеток, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

Следует понимать, что данный термин подразумевает ссылку не только на конкретную рассматриваемую клетку, но и на потомство такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут иметь место определенные модификации вследствие мутации либо влияния окружающей среды, такое потомство в действительности может не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему включаться в объем термина "клетка-хозяин", применяемого в данном документе.

Применяемые в данном документе термины "лечить", "лечащий"

и "лечение" относятся к терапевтическим или предупредительным мерам, описанным в данном документе. В способах "лечения" используется введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в данном документе, например, субъекту, имеющему заболевание или нарушение, ассоциированное с PAI-1 (например, фиброзное заболевание), или предрасположенному к наличию заболевания или нарушения, с целью предупреждения, излечения, задержки, снижения тяжести или улучшения одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения или рецидивирующего заболевания или нарушения или в целях продления срока жизни субъекта за пределы ожидаемого в отсутствие такого лечения.

Применяемый в данном документе термин "заболевание или нарушение, ассоциированное с PAI-1" включает болезненные состояния с симптомами, ассоциированными с болезненным состоянием, или без них, при которых обнаруживаются измененные уровни или активность PAI-1. Иллюстративные заболевания или нарушения, ассоциированные с PAI-1, включают различные типы фиброза.

Применяемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к такому количеству антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающих PAI-1, которое является достаточным для осуществления лечения, предсказания течения или диагностики заболевания или нарушения, ассоциированного с PAI-1, описанного в данном документе, при введении субъекту. Терапевтически эффективное количество будет варьировать в зависимости от субъекта и болезненного состояния, подвергаемых лечению, массы и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и т.п., что может без труда определить среднестатистический специалист в данной области. Дозы для введения могут варьировать, например, от приблизительно 1 нг до приблизительно 10000 мг, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5000 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в данном документе.

Режимы дозирования можно корректировать для получения оптимального терапевтического эффекта. Эффективным количеством также является такое, при котором любые токсичные или неблагоприятные эффекты (т.е. побочные эффекты) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента минимизированы или превосходятся благоприятными эффектами.

Применяемый в данном документе термин "субъект" или "млекопитающее" включает человека или любое отличное от человека животное.

Применяемый в данном документе термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, взаимодействующей со специфическим антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями антигена и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован аминокислотами из различных сегментов линейной полипептидной цепи, в пространственном отношении расположенными рядом. Линейный эпитоп образован прилежащими аминокислотными остатками в полипептидной цепи.

Здесь указано, что применяемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также включают ссылку на множественное число, если в контексте прямо не указано иное.

II. Антитела к PAI-1

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с PAI-1 человека. Иллюстративные аминокислотные последовательности VH, VL и CDR и нуклеотидные последовательности антител, раскрытых в данном документе, приведены в таблице 2. CDR-области, показанные в таблице 2, определены по IMGT.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности VH, VL и CDR иллюстративных
антител к PAI-1 или их фрагментов

АНТИТЕЛО	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO
mA105 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSIYWIE WVKQRPGLGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATF TADTSSNTAFMQLSSLTSEDSAVYYCARGGLYYDL DYWGQGTILTVSSAKTTPP	2
mA105 VL	DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWLLQRPQGSPQRLISLVSKLDSGVPDRFTGS GSGTDFTLKLSRVEGADLGVIYCWQDRHFPRFTGG GTKLEIKRAD	3
mA39 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQ WVKQRPBGHGLEWIGEILPGSNTNYNEKFKDKATFT ADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGIGLRGA LDYWGQGTSTVTVSSAKTTPP	4
mA39 VL	DIQMTHTSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLA YHQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQ FSLNIKSLQPEDFGTFYCQHRYGSPWTFGGGTKLE IKRAD	5
mA44 VH	EMQLQESGPSLVKPSQTLSTLCSVTGDSMTNGYWN WIRKFPGNKLEYMGYITYSGSTYYNPSLKGRISIT RNTSKNQYYLQLSSVTTEDTATYYCARWHYGSPYY FDYWGQGTTLTVSSAKTTPP	6
mA44 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSW LQQKPGKSPKTLIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQD YSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPPTFGGGTKLE IKRAD	7
mA71 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIE WIKQRPBGHGLDWIGEILPGSGNTNYNEKFKGKATF TADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGLYYNL DSWGQGTTLTVSSAKTTPP	8

mA71 VL	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK TYLYWLLQRPQGQSPKRLLIYLVSKLDSGVPDRFTGS GSGTDFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQDTHFPRTFGG GTKLEIKRAD	9
mA75 VH	QQQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIA WLKQRPBGHGLEWIAEILPGSGLTNYNEIFRGKATF TADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGLYYAM DYWGQGTSTVTVSSAKTTAP	80
mA75 VL	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASICKSSQSLLDSEGKT YLNWLFQRPQGQSPKRLLIYLVCKLDCGVPDRFTGSG SGTDFTLTKISRVEGEDLGVIYCWQGSHFPQTFGGG TKLEIKRAD	81
mB109 VH	EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMH WVKQRPBGGLEWMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGN SDTTYNQKFEDKAKLTAVASASTAYMEVSSLTNED SAVYYCTRGLRRWGAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPP	10
mB109 VL	DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSI PCKASQDVSSAVAW YQQKLGQSPKLLIYSASFRTYGVDPDRFTGSGSGTD FTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPYTFGGGTNLE IKRAD	11
mB28 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIE WIKQRPBGGLEWIGKILPGSGGANYNEKFKGKATVT ADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARLSTGTRGA FDYWGQGTTLTVSSAKTTPP	12
mB28 VL	DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVYSYLAW YQQKQKGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQ FSLKINYLQPEDFGSYYCQHHYGTPTFGGGTKVE IKRAD	13
mC45 VH	QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIE WIKQRPBGGLEWIGVIHPGSGVTNYNEKFKGKAIL TADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARDYYGSSH GLMDYWGQGTSTVTVSS	14

mC45 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDINSYLSW FQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQD YSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRTFGGGTKLE IK	15
mE16 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMS WVRQTPEKGLGWVASLRTGGNTYYSDSVKGRFTIS RDNDRNILYLQMSSLTSED TAVYYCARGLRHWGYF DVWGAGTTTVTVSS	16
mE16 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVSTAVGW YQQEPGQSPKLLIYSASNRHTGVPDRFTGSGSGTD FTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPWTFGGGTKLE IK	17
mE21 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMH WVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT EYDPKFQAKATM TADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCMYGNYPYYF DYWGQGTTTLTVSS	18
mE21 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLE IK	19
mA105 HCDR3	ARGGLYYDL DY	20
mA105 HCDR2	ILPGSGST	21
mA105 HCDR1	GFTFSIYW	22
mA105 LCD3	WQDRHFPRT	23
mA105 mA71 LCDR2	LVS	24
mA105 mA71 LCDR1	QSLDSDGKTY	25
mA39 HCDR3	ARLGIGLRGALDY	26
mA39 HCDR2	ILPGSNT	27
mA39 HCDR1	GYTFNIYW	28
mA39 LCDR3	QHRYGSPWT	29

mA39 LCDR2	NAK	30
mA39 LCDR1	ENIYSY	31
mA44 HCDR3	ARWHYGSPYYFDY	32
mA44 HCDR2	ITYSGST	33
mA44 HCDR1	GDSMTNGY	34
mA44 LCDR3	LQYDEFPT	35
mA44 LCDR2	RAN	36
mA44 LCDR1	QDINSY	37
mA71 HCDR3	ARGGLYYNLDS	38
mA71 HCDR2	ILPGSGNT	39
mA71 HCDR1	GFTFSTYW	40
mA71 LCDR3	WQDTHFPRT	41
mA71 LCDR2	LVS	42
mA71 LCDR1	QSLLDSDGKTY	43
mA75 HCDR3	ARGGLYYAMDY	44
mA75 HCDR2	ILPGSGLT	45
mA75 HCDR1	GFTFSTYW	46
mA75 LCDR3	WQGSHPQT	47
mA75 LCDR2	LVC	48
mA75 LCDR1	QSLLDSEGKTY	49
mB109 HCDR3	TRGLRRWGAMDY	50
mB109 HCDR2	ILPGSGLT	51

mB109 HCDR1	GFTFSTYW	52
mB109 LCDR3	QQHYSSPYT	53
mB109 LCDR2	SAS	54
mB109 LCDR1	QDVSSA	55
mB28 HCDR3	ARLSTGTRGAFDY	56
mB28 HCDR2	ILPGSGGA	57
mB28 HCDR1	GYTFSISW	58
mB28 LCDR3	QHHYGTPT	59
mB28 LCDR2	NAK	60
mB28 LCDR1	ENVYSY	61
mC45 HCDR3	ARDYYGSSHGLMDY	62
mC45 HCDR2	IHPGSGVT	63
mC45 HCDR1	GYAFTNYL	64
mC45 LCDR3	LQYDEFPT	65
mC45 LCDR2	RAN	66
mC45 LCDR1	QDINSY	67
mE16 HCDR3	ARGLRHWGYFDV	68
mE16 HCDR2	LRTGGNT	69
mE16 HCDR1	GFTFSNYG	70
mE16 LCDR3	QQHYSSPWT	71
mE16 LCDR2	SAS	72
mE16 LCDR1	QDISNY	73
mE21 HCDR3	MYGNYPYYFDY	74

mE21 HCDR2	IDPENGDT	75
mE21 HCDR1	GFNIKDYD	76
mE21 LCDR3	QQGNTLPWT	77
mE21 LCDR2	YTS	78
mE21 LCDR1	QDISNY	79

m = мышиный; VH = переменная область тяжелой цепи; VL = переменная область легкой цепи.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитела к PAI-1, связывающиеся с тем же эпитопом или осуществляющие конкурентное ингибирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащие аминокислотные последовательности VH- и VL-областей, приведенные в SEQ ID NO:6 и 7, соответственно. Такие антитела можно идентифицировать с помощью стандартных анализов конкурентного связывания, включающих, например, конкурентные анализы на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

III. Модифицированные антитела к PAI-1

В определенных вариантах осуществления антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или несколько модификаций. Модифицированные формы антител к PAI-1, раскрытых в данном документе, можно получить с помощью любых технологий, известных из уровня техники.

i) Снижение иммуногенности

В определенных вариантах осуществления антитела к PAI-1 или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, модифицируют для снижения их иммуногенности с помощью принятых в данной области техники технологий. Например, антитела или их фрагменты могут быть подвергнуты химеризации, гуманизации или деиммунизации.

В одном варианте осуществления антитело или его

антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, могут быть химерными. Химерное антитело представляет собой антитело, в котором различные части антитела происходят от различных видов животных, как, например, антитела, имеющие переменную область, происходящую из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека. Способы получения химерных антител или их фрагментов известны из уровня техники. См., например, Morrison, *Science* 229:1202, 1985; Oi et al., *BioTechniques* 4:214, 1986; Gillies et al., *J. Immunol. Methods* 125:191, 1989; патенты США № 5807715; 4816567 и 4816397, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Технологии, разработанные для получения "химерных антител" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312:604, 1984; Takeda et al., *Nature* 314:452, 1985), можно использовать для синтеза указанных молекул. Например, последовательность гена, отвечающая за специфичность связывания молекулы антитела мыши к PAI-1, можно слить с последовательностью молекулы антитела человека с соответствующей биологической активностью. Как применяется в данном документе, химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части происходят от различных видов животных, как, например, таковые, имеющие переменную область, происходящую из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека, например, гуманизированные антитела.

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, являются гуманизированными. Гуманизированные антитела обладают специфичностью связывания и содержат одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR), из антитела, отличного от человеческого, и каркасные области из молекулы антитела человека. Остатки каркасной области в каркасных областях человека часто заменяют соответствующими остатками из антитела-донора CDR для изменения или улучшения связывания с антигеном. Эти замены в каркасной области идентифицируют с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, например,

путем моделирования взаимодействий остатков CDR и каркасной области для идентификации остатков каркасной области, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для идентификации нетипичных остатков каркасной области в конкретных положениях. См., например, Queen *et al.*, патент США № 5585089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323, 1988, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антитела можно гуманизировать с помощью ряда технологий, известных из уровня техники, включающих, например, трансплантацию CDR (EP 239400; международная публикация № WO 91/09967; патенты США №№ 5225539; 5530101 и 5585089), венирование или изменение поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology* 28:489, 1991; Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7:805, 1994; Roguska *et al.*, *PNAS* 91:969, 1994) и перетасовку цепей (патент США № 5565332).

В конкретном варианте осуществления используют способ гуманизации, основанный на влиянии гибкости молекулы антитела в ходе и в отношении иммунного распознавания (см. международную публикацию № WO2009/032661, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Гибкость белка связана с молекулярной подвижностью молекулы белка. Гибкость белка представляет собой способность целого белка, части белка или отдельного аминокислотного остатка принимать ряд конформаций, значительно отличающихся друг от друга. Информацию о гибкости белка можно получить путем выполнения экспериментов по рентгеновской кристаллографии белков (см., например, Kundu *et al.*, *Biophys. J.* 83:723, 2002), экспериментов по ядерному магнитному резонансу (см., например, Freedberg *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 120:7916, 1998) или путем проведения молекулярно-динамического (MD) моделирования. MD-моделирование белка осуществляется на компьютере и позволяет определить подвижность всех атомов белка в течение определенного периода времени путем расчета физических взаимодействий атомов друг с другом. Результатом MD-моделирования является траектория исследуемого белка в течение периода времени моделирования. Траектория представляет собой совокупность конформаций белка, также

называемых моментальными снимками, отбор которых периодически производят в течение периода моделирования, например, каждую 1 пикосекунду (пс). Именно путем анализа совокупности моментальных снимков можно количественно определить гибкость аминокислотных остатков белка. Таким образом, гибким является остаток, принимающий ряд различных конформаций применительно к полипептиду, в котором этот остаток находится. MD-способы известны из уровня техники, см., например, Brooks *et al.* "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988). Некоторое программное обеспечение позволяет осуществлять MD-моделирование, как, например, Amber (см. Case *et al.* *J. Comp. Chem.* 26:1668, 2005; Brooks *et al.* *J. Comp. Chem.* 4:187, 1983; и MacKerell *et al.* (1998) в "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer *et al.*, eds. Chichester: John Wiley & Sons) или Impact (см. Rizzo *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*; 122:12898, 2000).

Большинство белковых комплексов обладают относительно большой и плоской утопленной поверхностью, и было показано, что гибкость партнеров по связыванию обеспечивает источник их пластичности, позволяя им приспосабливаться друг к другу по конформации (Sundberg and Mariuzza, *Structure* 8, R137-R142, 2000). В связи с этим было показано, что примеры "индуцированного соответствия" играют доминирующую роль на поверхностях контакта белков. В дополнение, имеется постоянно растущий объем данных, показывающих, что белки в действительности связываются с лигандами различных форм, размеров и состава (*Protein Science* 11:184-187, 2002) и что конформационное разнообразие, по-видимому, является существенной составляющей способности к распознаванию различных партнеров (James *et al.*, *Science* 299:1362, 2003). Гибкие остатки участвуют в связывании белковых партнеров (Grunberg *et al.*, *Structure* 14, 683, 2006).

Гибкие остатки могут принимать различные конформации, обеспечивающие наличие совокупности областей взаимодействия, которые, вероятно, распознаются В-клетками памяти и запускают

иммуногенную реакцию. Таким образом, антитело можно гуманизировать путем модификации количества остатков каркасной области таким образом, чтобы совокупность конформаций и областей распознавания, представленных в модифицированном антителе, как можно в большей степени напоминал таковой, принимаемый антителом человека. Этого можно достичь с помощью модификации ограниченного количества остатков посредством (1) построения гомологичной модели исходного mAb и проведения MD-моделирования; (2) анализа гибких остатков и идентификации наиболее гибких остатков молекулы антитела, отличного от человеческого, а также идентификации остатков или мотивов, которые являются вероятным источником для неоднородности или реакции распада; (3) идентификации антитела человека, в котором представлен ряд областей распознавания, наиболее сходный с таковым у исходного антитела; (4) определение гибких остатков, подлежащих мутации, при этом остатки или мотивы, которые являются вероятным источником для неоднородности и распада, также подвергаются мутации; и (5) проверка наличия известных Т-клеточных или В-клеточных эпитопов. Гибкие остатки можно обнаружить с помощью MD-расчетов, идея которых изложена в данном документе, с помощью предполагаемой модели растворителя, в которой учитывается взаимодействие водного растворителя с атомами белка в течение периода времени моделирования.

После идентификации набора гибких остатков в переменных областях легкой и тяжелой цепей идентифицируют набор каркасных областей в переменных областях тяжелой и легкой цепей человека, близко напоминающий таковой у антитела, представляющего интерес. Это можно осуществлять, например, с помощью BLAST-поиска набора гибких остатков по базе данных последовательностей антител человека в конфигурации зародышевой линии. Это также можно осуществлять путем сравнения динамических свойств исходного mAb с динамическими свойствами библиотеки канонических структур в конфигурации зародышевой линии. Остатки CDR и соседние остатки исключают из поиска для обеспечения сохранения высокой аффинности к антигену. Гибкие остатки затем заменяют.

Если несколько остатков от человека демонстрируют сходные уровни гомологии, то отбор также выполняют с учетом природы остатков, которые, вероятно, влияют на поведение гуманизированного антитела в растворе. Например, полярные остатки часто встречаются в поверхностных гибких петлях над гидрофобными остатками. Остатки, являющиеся потенциальным источником нестабильности и неоднородности, также подвергают мутации, даже если они находятся в CDR. Они будут включать поверхностные метиониновые остатки, поскольку кислородные радикалы могут вызывать образование сульфоксидов, кислотонеустойчивые связи, подвергаемые протеолитическому расщеплению, как, например, в дипептиде Asp-Pro (*Drug Dev. Res.* 61:137, 2004), участки дезамидирования, находящиеся в поверхностном аспарагиновом остатке, за которым расположена небольшая аминокислота, такая как Gly, Ser, Ala, His, Asn или Cys (*J. Chromatog.* 837:35, 2006), и участки N-гликозилирования, такие как участок Asn-X-Ser/Thr. Как правило, поверхностные метиониновые остатки будут замещены Leu, поверхностные аспарагиновые остатки будут заменены глутамином или аспаратом, или будет изменен следующий остаток. В участке гликозилирования (Asn-X-Ser/Thr) будет изменен остаток Asn или Ser/Thr.

Полученную в результате составную последовательность антитела проверяют на наличие известных В-клеточных или линейных Т-клеточных эпитопов. Поиск проводят, например, с использованием общедоступной базы данных по иммунным эпитопам (IEDB) (*PLOS Biol.* (2005) 3(3):e91). Если в составной последовательности обнаруживается известный эпитоп, то поиск и замещение проводится с другим набором последовательностей человека. Таким образом, в отличие от способа изменения поверхности из патента США № 5639641, данный способ обращен как на опосредованные В-клетками, так и на опосредованные Т-клетками иммуногенные реакции. Данный способ также избегает проблемы потери активности, иногда наблюдаемой при трансплантации CDR (патент США № 5530101). В дополнение, в способе конструирования и отбора также учитываются проблемы стабильности и растворимости, в результате чего получают антитело, оптимизированное для низкой иммуногенности,

высокой аффинности к антигену и улучшенных биофизических свойств.

В некоторых вариантах осуществления можно применять деиммунизацию для снижения иммуногенности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Применяемый в данном документе термин "деиммунизация" включает изменение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с модификацией Т-клеточных эпитопов (см., например, международные публикации №№ WO9852976A1, WO0034317A2). Например, можно анализировать последовательности VH и VL из исходного антитела, и для каждой V-области можно создавать "карту" Т-клеточных эпитопов человека, на которой показано местоположение эпитопов относительно областей, определяющих комплементарность (CDR), и других ключевых остатков в последовательности. Отдельные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов анализируют с целью идентификации альтернативных аминокислотных замен с низким риском изменения активности конечного антитела. Конструируют ряд альтернативных последовательностей VH и VL, содержащих комбинации аминокислотных замен, и эти последовательности затем встраивают в ряд PAI-1-специфичных антител или их фрагментов, которые затем тестируют в отношении функции, для применения в способах диагностики и лечения, раскрытых в данном документе. Как правило, создают и тестируют от 12 до 24 вариантов антител. Полные гены тяжелой и легкой цепей, содержащие модифицированные V- и С-области человека, затем клонируют в векторы экспрессии, и полученные в результате этого плазмиды вводят в линии клеток для получения целого антитела. Антитела затем сравнивают в подходящих биохимических и биологических анализах, и идентифицируют оптимальный вариант.

ii) Эффекторные функции и модификации Fc

Антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, могут содержать константную область антитела (например, константную область IgG, константную область IgG человека, константную область IgG1 или IgG4 человека), опосредующую одну или несколько эффекторных функций. Например, связывание компонента C1 системы комплемента с константной областью антитела может активировать

систему комплемента. Активация системы комплемента важна для опсонизации и лизиса клеточных патогенов. Активация системы комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может также быть вовлечена в аутоиммунную гиперчувствительность. Кроме того, антитела связываются с рецепторами на поверхности различных клеток посредством Fc-области с помощью участка связывания с Fc-рецептором в Fc-области антитела, связывающегося с Fc-рецептором (FcR) на поверхности клетки. Существует несколько Fc-рецепторов, специфичных для различных классов антител, в том числе IgG (гамма-рецепторы), IgE (эпсилон-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхности клеток запускает несколько важных и разнообразных биологических реакций, включающих поглощение и разрушение частиц, покрытых антителами, выведение иммунных комплексов, лизис клеток-мишеней, покрытых антителами, клетками-киллерами (называемый антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью или ADCC), высвобождение медиаторов воспаления, трансплацентарный перенос и регуляцию выработки иммуноглобулинов. В определенных вариантах осуществления антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, связываются с Fc-гамма-рецептором. В альтернативных вариантах осуществления антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, могут содержать константную область, лишенную одной или нескольких эффекторных функций (например, активности ADCC) или неспособную к связыванию с Fc-рецептором.

Определенные варианты осуществления, раскрытые в данном документе, включают антитела к PAI-1, в которых по меньшей мере одна аминокислота в одном или нескольких доменах константной области была удалена или иным образом изменена для обеспечения желаемых биохимических характеристик, таких как ослабленные или усиленные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, повышенная способность к локализации в конкретном участке организма (например, в месте локализации опухоли или в конкретном органе), уменьшенный период полувыведения из сыворотки крови или увеличенный период полувыведения из сыворотки крови по сравнению с целым, неизмененным антителом,

имеющим примерно такую же иммуногенность. Например, определенные антитела или их фрагменты для применения в способах диагностики и лечения, описанных в данном документе, представляют собой антитела с удаленными доменами, содержащие полипептидную цепь, сходную с тяжелой цепью иммуноглобулина, но в которой недостает по меньшей мере части одного или нескольких доменов тяжелой цепи. Например, в определенных антителах один целый домен константной области модифицированного антитела будет удален, например, весь CH2-домен или его часть будут удалены.

В определенных других вариантах осуществления антитела к PAI-1 содержат константные области, происходящие из различных изотипов антител (например, константные области из двух или более из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека). В других вариантах осуществления антитела к PAI-1 содержат химерную шарнирную область (т.е. шарнирную область, содержащую части шарнирной области, происходящие из шарнирных доменов различных изотипов антител, например, верхний шарнирный домен из молекулы IgG4 и средний шарнирный домен IgG1). В одном варианте осуществления антитело к PAI-1 содержит Fc-область или ее часть из молекулы IgG4 человека и мутацию Ser228Pro (нумерация по Kabat) в коровой шарнирной области молекулы.

В определенных антителах к PAI-1 Fc-часть можно подвергать мутации для повышения или снижения эффекторной функции с использованием технологий, известных из уровня техники. Например, удаление или инактивация (с помощью точечных мутаций или других средств) домена константной области могут ослаблять связывание циркулирующего модифицированного антитела с Fc-рецептором, увеличивая, таким образом, локализацию в опухоли. В других случаях может быть, что модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением ослабляют связывание комплемента и, таким образом, уменьшают период полувыведения из сыворотки крови и неспецифическое связывание конъюгированного цитотоксина. Еще некоторые модификации константной области можно применять для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, обеспечивающей повышение локализации вследствие увеличения специфичности к антигену или гибкости.

Обусловленные этим физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация в опухоли, биораспределение и период полувыведения из сыворотки крови, можно легко измерить и определить количественно с помощью хорошо известных иммунологических технологий без проведения излишних экспериментов.

В определенных вариантах осуществления Fc-домен, используемый в антителе, раскрытом в данном документе, представляет собой вариант Fc. Применяемый в данном документе термин "вариант Fc" относится к Fc-домену, имеющему по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-доменом дикого типа, из которого происходит указанный Fc-домен. Например, в тех случаях, когда Fc-домен происходит из антитела IgG1 человека, вариант Fc указанного Fc-домена IgG1 человека содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с указанным Fc-доменом.

Аминокислотная (аминокислотные) замена (замены) в варианте Fc могут находиться в любом положении (т.е. в любом аминокислотном положении согласно системе нумерации EU) в Fc-доме. В одном варианте осуществления вариант Fc содержит замену в аминокислотном положении, находящемся в шарнирном домене или его части. В другом варианте осуществления вариант Fc содержит замену в аминокислотном положении, находящемся в CH2-доме или его части. В другом варианте осуществления вариант Fc содержит замену в аминокислотном положении, находящемся в CH3-доме или его части. В другом варианте осуществления вариант Fc содержит замену в аминокислотном положении, находящемся в CH4-доме или его части.

В антителах, раскрытых в данном документе, может использоваться любой принятый в данной области техники вариант Fc, о котором известно, что он вызывает улучшение (например, ослабление или усиление) эффекторной функции или связывания с FcR. Указанные варианты Fc могут содержать, например, любую из аминокислотных замен, раскрытых в международных публикациях согласно PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2,

WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 и WO06/085967A2 или патентах США №№ 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253 и 7083784, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. В одном иллюстративном варианте осуществления антитело, раскрытое в данном документе, может содержать вариант Fc, содержащий аминокислотную замену в положении 268 согласно EU (например, H268D или H268E). В другом иллюстративном варианте осуществления антитело, раскрытое в данном документе, может содержать аминокислотную замену в положении 239 согласно EU (например, S239D или S239E) или в положении 332 согласно EU (например, I332D или I332Q).

В определенных вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, может содержать вариант Fc, содержащий аминокислотную замену, изменяющую независимые от антигена эффекторные функции антитела, в частности, период полувыведения антитела из крови. Такие антитела проявляют повышенное или сниженное связывание с FcRn по сравнению с антителами, не имеющими этих замен, и, таким образом, имеют увеличенный или уменьшенный период полувыведения из сыворотки крови, соответственно. Варианты Fc с улучшенным сродством к FcRn предположительно имеют более длительные периоды полувыведения из сыворотки крови, и такие молекулы имеют полезные пути применения в способах лечения млекопитающих, где желательным является длительный период полувыведения вводимого антитела, например, для лечения хронических заболеваний или нарушений. В противоположность этому, ожидается, что варианты Fc со сниженным сродством связывания с FcRn будут иметь более короткие периоды полувыведения, и такие молекулы также являются применимыми, например, для введения млекопитающему, где сокращенное время циркуляции может быть преимущественным, например, для диагностической визуализации *in vivo* или в ситуациях, где

исходное антитело имеет токсичные побочные эффекты, если оно присутствует в кровотоке в течение продолжительных периодов времени. Варианты Fc со сниженным сродством связывания с FcRn также с меньшей долей вероятности пересекают плацентарный барьер и, таким образом, также являются применимыми в лечении заболеваний или нарушений у беременных женщин. В дополнение, другие пути применения, в которых сниженное сродство связывания с FcRn может быть желательным, включают те пути применения, в которых желательной является локализация в головном мозге, почке или печени. В одном иллюстративном варианте осуществления измененные антитела, раскрытые в данном документе, характеризуются сниженным переносом через эпителий почечных клубочков из сосудистой системы. В другом варианте осуществления измененные антитела, раскрытые в данном документе, характеризуются сниженным переносом через гематоэнцефалический барьер (BBB) из головного мозга во внутрисосудистое пространство. В одном варианте осуществления антитело с измененным связыванием с FcRn содержит Fc-домен, имеющий одну или несколько аминокислотных замен в "FcRn-связывающей петле" Fc-домена. FcRn-связывающая петля содержит аминокислотные остатки 280-299 (согласно нумерации по Kabat). Иллюстративные аминокислотные замены, изменяющие активность связывания с FcRn, раскрыты в международной публикации согласно РСТ № WO05/047327, включенной в данный документ посредством ссылки. В определенных иллюстративных вариантах осуществления антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, содержат Fc-домен, имеющий одну или несколько следующих замен: V284E, H285E, N286D, K290E и S304D (нумерация по Kabat).

В других вариантах осуществления антитела для применения в способах диагностики и лечения, описанных в данном документе, имеют константную область, например, константную область тяжелой цепи IgG1 или IgG4, измененную для снижения или устранения гликозилирования. Например, антитело, раскрытое в данном документе, также может содержать вариант Fc, содержащий аминокислотную замену, изменяющую гликозилирование антитела. Например, указанный вариант Fc может характеризоваться сниженным

гликозилированием (например, N- или O-сцепленным гликозилированием). В иллюстративных вариантах осуществления вариант Fc имеет сниженное гликозилирование N-сцепленного гликана, обычно находящегося в аминокислотном положении 297 (нумерация согласно EU). В другом варианте осуществления антитело имеет аминокислотную замену возле мотива гликозилирования, например, N-сцепленного мотива гликозилирования, содержащего аминокислотную последовательность NXT или NXS, или в нем. В конкретном варианте осуществления антитело содержит вариант Fc с аминокислотной заменой в аминокислотном положении 228 или 299 (нумерация согласно EU). В более конкретных вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG1 или IgG4, содержащую мутации S228P и T299A (нумерация согласно EU).

Иллюстративные аминокислотные замены, придающие сниженное или измененное гликозилирование, раскрыты в международной публикации согласно РСТ № WO05/018572, включенной в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, модифицируют для устранения гликозилирования. Такие антитела или их фрагменты могут называться "агликозилированными" антителами или их фрагментами (например, "агликозилированными" антителами). Не желая ограничиваться конкретной теорией, полагают, что "агликозилированные" антитела или их фрагменты могут иметь улучшенный профиль безопасности и стабильности *in vivo*. Иллюстративные агликозилированные антитела или их фрагменты содержат агликозилированную Fc-область антитела IgG4, лишенную эффекторной функции Fc с устранением, таким образом, потенциальной токсичности, опосредованной Fc, по отношению к нормальным жизненно важным органам, в которых экспрессируется PAI-1. В еще некоторых вариантах осуществления антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, содержат измененный гликан. Например, антитело может иметь сниженное количество остатков фукозы в N-гликане в Asn297 Fc-области, т.е. являться афукозилированным. В другом варианте осуществления антитело может иметь измененное количество остатков сиаловой кислоты в N-

гликане в Asn297 Fc-области.

iii) Ковалентное присоединение

Антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, можно модифицировать, например, посредством ковалентного присоединения молекулы к антителу таким образом, чтобы ковалентное присоединение не препятствовало специфическому связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Например, но не с целью ограничения, антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно модифицировать путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, образования связи с клеточным лигандом или другим белком и т.п. Любые из многочисленных химических модификаций можно осуществлять с помощью известных технологий, включающих, без ограничения, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование и т.п. Дополнительно, производное может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

Антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно дополнительно подвергать рекомбинантному слиянию с гетерологичным полипептидом на N- или C-конце или химической конъюгации (в том числе ковалентным и нековалентным видам конъюгации) с полипептидами или другими соединениями. Например, антитела к PAI-1 можно подвергать рекомбинантному слиянию или конъюгации с молекулами, применимыми в качестве меток в анализах на обнаружение, и эффекторными молекулами, такими как гетерологичные полипептиды, лекарственные средства, радионуклиды или токсины. См., например, международные публикации согласно РСТ №№ WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5314995 и EP 396387.

Антитела к PAI-1 можно сливать с гетерологичными полипептидами для увеличения периода полувыведения *in vivo* или для применения в иммунологических анализах с помощью способов, известных из уровня техники. Например, в одном варианте осуществления PEG можно конъюгировать с антителами к PAI-1, раскрытыми в данном документе, для увеличения их периода

полувыведения *in vivo*. (Leong, S. R., et al., *Cytokine* 16:106, 2001; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531, 2002; или Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30:512, 2002).

Кроме того, антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, можно сливать с маркерными последовательностями, такими как пептиды, для облегчения их очистки или обнаружения. В определенных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистидиновый пептид, такой как метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Чатсворт, Калифорния, 91311), среди прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Гексагистидин, описанный, например, в Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, 1989, обеспечивает удобную очистку белка слияния. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают, без ограничения, метку "HA", соответствующую эпитопу, происходящему из белка гемагглютинаина вируса гриппа (Wilson et al., *Cell* 37:767, 1984), и метку "FLAG".

Антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, можно применять в неконъюгированной форме или можно конъюгировать по меньшей мере с одной из ряда молекул, например, для улучшения терапевтических свойств молекулы, для облегчения обнаружения мишеней или для визуализации или терапии у пациента. Антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, можно метить или конъюгировать до или после очистки, если проводят очистку. В частности, антитела к PAI-1, раскрытые в данном документе, можно конъюгировать с терапевтическими средствами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологических реакций, фармацевтическими средствами или PEG.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает антитела к PAI-1, конъюгированные с диагностическим или терапевтическим средством. Антитела к PAI-1 можно применять в целях диагностики, например, для отслеживания развития или прогрессирования нарушения со стороны иммунных клеток (например, CLL) в качестве части процедуры клинического испытания, например, для определения эффективности указанного режима лечения или

предупреждения. Обнаружение можно облегчить путем присоединения антитела к PAI-1 к выявляемому веществу. Примеры выявляемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, позитронно-активные металлы в случае применения различных видов позитронно-эмиссионной томографии и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. См., например, патент США № 4741900 в отношении ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств согласно настоящему изобретению. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; неограничивающие примеры подходящих комплексов с простетическими группами включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламинофлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; неограничивающий пример люминесцентного материала включает люминол; неограничивающие примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; и неограничивающие примеры подходящего радиоактивного материала включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In или ^{99}Tc .

Антитела к PAI-1 для применения в способах диагностики и лечения, раскрытых в данном документе, можно конъюгировать с цитотоксинами (такими как радиоактивные изотопы, цитотоксические лекарственные средства или токсины), терапевтическими средствами, цитостатическими средствами, биологическими токсинами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологических реакций, фармацевтическими средствами, иммуноактивными лигандами (например, лимфокинами или другими антителами, где полученная в результате молекула связывается как с неопластической клеткой, так и с эффекторной клеткой, такой как Т-клетка) или PEG.

В другом варианте осуществления антитело к PAI-1 для применения в способах диагностики и лечения, раскрытых в данном

документе, можно конъюгировать с молекулой, ослабляющей рост опухолевых клеток. В других вариантах осуществления раскрытые композиции могут содержать антитела или их фрагменты, присоединенные к лекарственным средствам или пролекарствам. Еще несколько других вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, включают применение антител или их фрагментов, конъюгированных со специфическими биотоксинами или их цитотоксичными фрагментами, такими как рицин, гелонин, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин. Выбор конъюгированного или неконъюгированного антитела для применения будет зависеть от типа и стадии рака, применения вспомогательного лечения (например, химиотерапии или внешнего облучения) и состояния пациента. Будет понятно, что специалист в данной области может без труда осуществить такой отбор, учитывая идеи, изложенные в данном документе.

Будет понятно, что противоопухолевые антитела, меченные изотопами, успешно применялись в предыдущих исследованиях для разрушения опухолевых клеток в животных моделях и в некоторых случаях у людей. Иллюстративные радиоактивные изотопы включают: ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re и ^{188}Re . Радионуклиды действуют путем испускания ионизирующего излучения, которое вызывает множественные разрывы нитей в ядерной ДНК, что приводит к гибели клеток. Изотопы, применяемые для получения терапевтических конъюгатов, обычно испускают высокоэнергетические альфа- или бета-частицы, имеющие короткую длину пробега. Такие радионуклиды убивают клетки, с которыми они находятся в непосредственной близости, например, неопластические клетки, к которым прикрепляется или в которые поступает конъюгат. Эффект, оказываемый ими на нелокализованные клетки, является незначительным или отсутствует. Радионуклиды являются практически неиммуногенными.

IV. Экспрессия антител к PAI-1 или их антигенсвязывающих фрагментов

После манипуляции с выделенным генетическим материалом с получением антител к PAI-1, раскрытых в данном документе, как изложено выше, гены обычно встраивают в вектор экспрессии для

введения в клетки-хозяева, которые можно применять для получения желаемого количества заявляемых антител или их фрагментов.

В других вариантах осуществления антитела к PAI-1 или их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно экспрессировать с использованием полицистронных конструкций. В таких системах экспрессии несколько продуктов генов, представляющих интерес, таких как тяжелая и легкая цепи антител, можно получать из одной полицистронной конструкции. В этих системах преимущественно используется участок внутренней посадки рибосомы (IRES) для получения относительно высоких уровней полипептидов, раскрытых в данном документе, в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980, включенном в данный документ посредством ссылки. Специалистам в данной области будет понятно, что такие системы экспрессии можно применять для эффективного получения полного спектра полипептидов, раскрытых в настоящей заявке.

В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, применяемая для экспрессии антител, происходит от млекопитающих; специалисты в данной области могут определить конкретные линии клеток-хозяев, которые лучше всего подходят для экспрессии в них желаемого продукта гена. Иллюстративные линии клеток-хозяев включают, без ограничения, DG44 и DUXB11 (линии клеток яичника китайского хомячка, DHFR-отрицательные), HELA (клетки карциномы шейки матки человека), CVI (линию клеток почки обезьяны), COS (производную CVI с Т-антигеном SV40), R1610 (фибробласты китайского хомячка), BALBC/3T3 (фибробласты мыши), HAK (линию клеток почки хомяка), SP2/O (клетки миеломы мыши), BFA-1c1BPT (бычьи эндотелиальные клетки), RAJI (лимфоциты человека), 293 (клетки почки человека). В одном варианте осуществления линия клеток предусматривает измененное гликозилирование, например, афукозилирование, антитела, экспрессируемого в ней (например, линии клеток PER.C6.RTM. (Crucell) или CHO с нокаутом FUT8 (клетки Potelligent.RTM.) (Biowa, Принстон, Нью-Джерси)). В одном варианте осуществления можно применять клетки NS0. Клетки CHO можно применять в определенных конкретных вариантах осуществления. Линии клеток-хозяев обычно доступны от

коммерческих служб, Американской коллекции типовых культур или из опубликованных литературных источников.

Получение *in vitro* позволяет проводить расширение масштабов с получением больших количеств желаемых полипептидов. Технологии культивирования клеток млекопитающих в условиях культуры ткани известны из уровня техники и включают культивирование в однородной суспензии, например, в аэролифтным реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием, или культивирование иммобилизованных или захваченных клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на микрогранулах агарозы или в керамических картриджах. При необходимости или по желанию растворы полипептидов можно очищать с помощью традиционных хроматографических способов, например, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на DEAE-целлюлозе или (иммуно-)аффинной хроматографии.

Гены, кодирующие антитела к PAI-1 или их фрагменты, раскрытые в данном документе, также можно экспрессировать в клетках, отличных от клеток млекопитающих, таких как бактериальные, или дрожжевые, или растительные клетки. В этом отношении будет понятно, что различные одноклеточные микроорганизмы, отличные от млекопитающих, такие как бактерии, т.е. способные к выращиванию в культурах или брожению, также можно трансформировать. Бактерии, подверженные трансформации, включают представителей Enterobacteriaceae, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; Bacillaceae, таких как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Дополнительно будет понятно, что при экспрессии у бактерий полипептиды могут стать частью телец-включений. Полипептиды должны быть выделены, очищены и затем собраны в функциональные молекулы.

В дополнение к прокариотам, также можно использовать эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обыкновенные пекарские дрожжи, являются наиболее широко используемыми среди эукариотических микроорганизмов, хотя ряд других штаммов является общедоступным. Для экспрессии у *Saccharomyces* обычно применяют, например, плазмиду YRp7

(Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)). Эта плаزمида уже содержит ген TRP1, представляющий собой маркер отбора для мутантного штамма дрожжей, у которого отсутствует способность к росту на триптофанае, например, ATCC № 44076 или PER4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). Наличие повреждения TRP1 в качестве характеристики генома дрожжевой клетки-хозяина в этом случае обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации по росту в отсутствие триптофана.

V. Фармацевтические составы и способы введения антител к PAI-1

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело к PAI-1 или его фрагмент.

Способы получения и введения субъекту антител или их фрагментов, раскрытых в данном документе, хорошо известны специалистам в данной области или могут быть без труда ими определены. Путь введения антител или их фрагментов, раскрытых в данном документе, может быть пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Термин "парентеральный", применяемый в данном документе, включает внутривенное, внутриартериальное, внутривбрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. В определенных вариантах осуществления можно применять внутривенную, внутриартериальную, подкожную и внутримышечную формы парентерального введения. Хотя все эти формы введения однозначно рассматриваются как входящие в объем, раскрытый в данном документе, форма для введения может представлять собой раствор для инъекции, в частности, для внутривенной или внутриартериальной инъекции или капельного введения. Подходящая фармацевтическая композиция для инъекции обычно может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизатор (например, человеческий альбумин) и т.п. Однако, в других способах, соответствующих идеям, изложенным в данном документе, полипептиды можно доставлять непосредственно в место локализации популяции

нежелательных клеток, усиливая, таким образом, воздействие терапевтического средства на пораженную ткань.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и буферные среды. В рассматриваемом изобретении фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, 0,01–0,1 М (например, 0,05 М) фосфатного буфера или 0,8% физиологического раствора. Другие общераспространенные инертные вещества для парентерального введения включают растворы фосфата натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Инертные вещества для внутривенного введения включают добавки жидкости и питательных веществ, добавки электролитов, как, например, на основе раствора Рингера с декстрозой, и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразователи и инертные газы и т.п. Более конкретно, фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы сохранялась легкая возможность ее введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и в варианте осуществления ее будут предохранять от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать,

например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достичь с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимерозала и т.п. В определенных вариантах осуществления в композицию включены изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Длительного всасывания инъекционных композиций можно добиться путем включения в композицию средства, задерживающего всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае стерильные инъекционные растворы можно получить путем включения активного соединения (например, антитела самого по себе или в комбинации с другими активными средствами) в необходимом количестве в соответствующем растворителе вместе с одним ингредиентом или комбинацией таковых, перечисленных в данном документе, в случае необходимости, с последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильное инертное вещество, которое содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов способы получения могут представлять собой вакуумную сушку и сублимационную сушку, в результате которых получают порошковую форму активного ингредиента с любым дополнительным желательным ингредиентом из его раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации. Препараты для инъекций обрабатывают, ими наполняют контейнеры, такие как ампулы, пакеты, колбы, шприцы или флаконы, которые при этом герметично закрывают в асептических условиях согласно способам, известным из уровня техники. Кроме того, препараты могут быть упакованы и продаваться в форме набора, такого как описанный в находящихся одновременно на рассмотрении заявке на патент США с регистрационным № 09/259337 и заявке на патент США с регистрационным № 09/259338, каждая из которых

включена в данный документ посредством ссылки. Такие изделия в варианте осуществления будут иметь этикетки или листки-вкладыши в упаковке, на которых указано, что соответствующие композиции применимы для лечения субъекта, страдающего от аутоиммунных или неопластических нарушений или предрасположенного к ним.

Эффективные дозы стабилизированных антител или их фрагментов, раскрытых в данном документе, для лечения вышеописанных состояний варьируют в зависимости от многих различных факторов, в том числе от способа введения, целевого участка, физиологического состояния пациента, без различия в отношении того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарств и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациент является человеком, но также можно лечить отличных от человека млекопитающих, в том числе трансгенных млекопитающих. Лечебные дозы можно подобрать с помощью стандартных способов, известных специалистам в данной области, для оптимизации безопасности и эффективности.

Для пассивной иммунизации антителом, раскрытым в данном документе, доза может варьировать в диапазоне, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и в более обычном случае от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг и т.п.) массы тела реципиента. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг, или в конкретных вариантах осуществления составлять по меньшей мере 1 мг/кг. Подразумевается, что промежуточные дозы в вышеуказанных диапазонах также входят в объем, раскрытый в данном документе.

Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, через день, еженедельно или согласно любой другой схеме, определенной путем эмпирического анализа. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение нескольких доз в течение продолжительного периода времени, например, по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные иллюстративные режимы лечения предусматривают введение раз в две недели, или раз в месяц, или раз в 3-6 месяцев. Иллюстративные схемы дозирования включают

введение 1-10 мг/кг или 15 мг/кг в последовательные дни, 30 мг/кг в чередующиеся дни или 60 мг/кг еженедельно. В некоторых способах два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания вводят одновременно, и в этом случае доза каждого вводимого антитела может находиться в пределах указанных диапазонов.

Антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно вводить несколько раз. Интервалы между отдельными введениями доз могут составлять, например, день, неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, как указывает измерение уровней полипептида или целевой молекулы в крови пациента. В некоторых способах дозу корректируют для достижения определенной концентрации антитела или токсина в плазме крови, например, 1-1000 мкг/мл или 25-300 мкг/мл. Альтернативно, антитела или их фрагменты можно вводить в качестве состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Доза и частота варьируют в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. Как правило, гуманизированные антитела демонстрируют наибольший период полувыведения, а после них располагаются химерные антитела и антитела, отличные от человеческих. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно вводить в неконъюгированной форме. В другом варианте осуществления антитела, раскрытые в данном документе, можно вводить несколько раз в конъюгированной форме. В еще одном варианте осуществления антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно вводить в неконъюгированной форме, а затем в конъюгированной форме или наоборот.

Доза и частота введения будут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических путях применения композиции, содержащие антитела по настоящему изобретению или их коктейль, вводят пациенту, еще не находящемуся в болезненном состоянии, для повышения устойчивости пациента. Такое количество определяется как "профилактическая эффективная доза". В данном пути применения точные количества опять-таки зависят от состояния

здоровья и общего иммунитета пациента, но обычно варьируют в диапазоне от 0,1 до 25 мг на дозу, в частности, от 0,5 до 2,5 мг на дозу. Относительно низкую дозу вводят с относительно длительными интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение их оставшейся жизни.

В терапевтических путях применения иногда необходимо введение относительно высокой дозы (например, от приблизительно 1 до 400 мг/кг антитела на дозу, при этом дозы от 5 до 25 мг более широко применяются для радиоиммуноконъюгатов, а более высокие дозы – для молекул, конъюгированных с цитотоксическими лекарственными средствами) с относительно короткими интервалами до уменьшения или прекращения прогрессирования заболевания и, в конкретных вариантах осуществления, до тех пор, пока пациент не продемонстрирует частичное или полное уменьшение интенсивности симптомов заболевания. После этого пациенту можно производить введение в профилактическом режиме.

В одном варианте осуществления субъекта можно обрабатывать молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, раскрытый в данном документе (например, в векторе). Дозы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, варьируют от приблизительно 10 нг до 1 г, от 100 нг до 100 мг, от 1 мкг до 10 мг или от 30 до 300 мкг ДНК на пациента. Дозы для инфекционных вирусных векторов варьируют от 10 до 100 или более вирионов на дозу.

Терапевтические средства можно вводить с помощью парентерального, местного, внутривенного, перорального, подкожного, внутриартериального, внутричерепного, внутрибрюшинного, интраназального или внутримышечного способов для профилактического или терапевтического лечения. Для введения антитела, раскрытого в данном документе, можно применять внутримышечную инъекцию или внутривенную инфузию. В некоторых способах терапевтические антитела или их фрагменты инъецируют непосредственно в череп. В некоторых способах антитела или их фрагменты вводят в качестве композиции или устройства с замедленным высвобождением, как, например, устройства Medipad™.

Средства, раскрытые в данном документе, можно необязательно

вводить в комбинации с другими средствами, эффективными в лечении нарушения или состояния, которое нужно лечить (например, профилактическом или терапевтическом). Дополнительные средства приняты в данной области техники и вводятся обычным способом при конкретном нарушении.

Эффективные одноразовые лечебные дозы (т.е. терапевтически эффективные количества) антител, меченных ^{90}Y , раскрытых в данном документе, варьируют в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 75 мКи и в варианте осуществления от приблизительно 10 до приблизительно 40 мКи. Эффективные одноразовые лечебные дозы, не разрушающие костный мозг, антител, меченных ^{131}I , раскрытых в данном документе, варьируют в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 70 мКи и в варианте осуществления от приблизительно 5 до приблизительно 40 мКи. Эффективные одноразовые лечебные разрушающие дозы (т.е. при которых может потребоваться аутологическая трансплантация костного мозга) антител, меченных ^{131}I , раскрытых в данном документе, варьируют в диапазоне от приблизительно 30 до приблизительно 600 мКи и в варианте осуществления от приблизительно 50 до менее чем приблизительно 500 мКи. В отношении химерного модифицированного антитела, в связи с более длительным периодом полувыведения из крови по сравнению с антителами мыши, эффективные одноразовые лечебные дозы, не разрушающие костный мозг, химерных антител, меченных йодом- 131 , варьируют в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 40 мКи и в варианте осуществления составляют менее чем приблизительно 30 мКи. Критерии визуализации, например, для метки ^{111}In обычно составляют менее чем приблизительно 5 мКи.

Хотя большая часть клинического опыта была приобретена с ^{131}I и ^{90}Y , другие радиоактивные метки известны в данной области техники и применяются для аналогичных целей. Еще несколько других радиоактивных изотопов применяют для визуализации. Например, дополнительные радиоактивные изотопы, соответствующие объему настоящего изобретения, включают, без ограничения, ^{123}I , ^{125}I , ^{32}P , ^{57}Co , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{77}Br , ^{81}Rb , ^{81}Kr , ^{87}Sr , ^{113}In , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb , ^{206}Bi , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{212}Pb ,

^{212}Bi , ^{47}Sc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{153}Sm , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{225}Ac , ^{211}At , ^{213}Bi . В этом отношении все альфа-, гамма- и бета-излучатели соответствуют настоящему изобретению. Дополнительно, ввиду настоящего раскрытия предполагается, что специалист в данной области сможет без труда определить, какие радионуклиды соответствуют выбранному курсу лечения, без проведения излишних экспериментов. В связи с этим дополнительные радионуклиды, уже применявшиеся в клинической диагностике, включают ^{125}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{67}Ga , ^{68}Ga , а также ^{111}In . Антитела также метили рядом радионуклидов для потенциального применения в направленной иммунотерапии (Peirersz *et al.* Immunol. Cell Biol. 65: 111, 1987). Эти радионуклиды включают ^{188}Re и ^{186}Re , а также ^{199}Au и ^{67}Cu в меньшей степени. В патенте США № 5460785 представлены дополнительные данные в отношении таких радиоактивных изотопов, и он включен в данный документ посредством ссылки.

Как обсуждалось ранее, антитела или их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения нарушений у млекопитающих *in vivo*. В связи с этим будет понятно, что раскрытые антитела или их фрагменты будут составлены таким образом, чтобы облегчать введение и способствовать стабильности активного средства. А в определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т.п. Для целей настоящего изобретения будут придерживаться того, что фармацевтически эффективное количество антитела, раскрытого в данном документе, конъюгированного или неконъюгированного с терапевтическим средством, означает количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью и для достижения благоприятного эффекта, например, для уменьшения интенсивности симптомов заболевания или нарушения или для обнаружения вещества или клетки. В случае опухолевых клеток полипептид в определенных вариантах осуществления будет способен к взаимодействию с определенными иммунореактивными антигенами на поверхности

неопластических или иммунореактивных клеток и обеспечивать увеличение частоты гибели этих клеток. Как известно, фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, можно вводить в одной или нескольких дозах для обеспечения фармацевтически эффективного количества полипептида.

Исходя из объема настоящего раскрытия антитела, раскрытые в данном документе, можно вводить человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать терапевтический или профилактический эффект. Полипептиды, раскрытые в данном документе, можно вводить такому человеку или другому животному в традиционной лекарственной форме, получаемой путем объединения антитела, раскрытого в данном документе, с традиционным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем согласно известным технологиям. Специалисту в данной области будет понятно, что форма и тип фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяются количеством активного ингредиента, с которым его следует объединить, путем введения и другими хорошо известными переменными факторами. Специалистам в данной области дополнительно будет понятно, что коктейль, содержащий один или несколько видов полипептидов согласно настоящему изобретению, может оказаться особенно эффективным.

VI. Способы лечения заболеваний или нарушений, ассоциированных с PAI-1

Антитела к PAI-1 или их фрагменты, раскрытые в данном документе, применимы для обеспечения антагонизма по отношению к активности PAI-1. Соответственно, в другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения заболеваний или нарушений, ассоциированных с PAI-1, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей одно или несколько антител к PAI-1 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе.

Ассоциированные с PAI-1 заболевания или нарушения, поддающиеся лечению, включают, без ограничения, патофизиологические состояния, такие как фиброз почек, печени или легких или предупреждаемое образование спаек в брюшной

полости.

Появление спаек внутри брюшной полости является основной причиной болезни человека. Осложнения спаек могут быть серьезными, такими как кишечная непроходимость, опасная для жизни, но хроническая тазовая боль и бесплодие у женщин также являются распространенными последствиями перитонеальных спаек. Большинство спаек вызывается хирургическим вмешательством, хотя в некоторых случаях также было показано, что их образование обусловлено воспалением, эндометриозом, химическим перитонитом, лучевой терапией, реакцией на инородные тела и хроническим перитонеальным диализом в амбулаторных условиях. Повреждение брюшины вызывает местную воспалительную реакцию, приводящую к отложению фибрина. Можно предположить, что посттравматическая недостаточность фибринолитической активности брюшины, обусловленная снижением уровня тканевого активатора плазминогена (tPA) и повышением уровней ингибиторов активаторов плазминогена PAI-1 и PAI-2, позволяет отложенному фибрину организоваться в долговременные спайки.

Доступный в настоящее время и эффективный вариант лечения, такой как применение Seprafilm®, имеет ограничения, заключающиеся в использовании только при открытом доступе (лапаротомии), и не может использоваться в лапароскопии. Продолжается поиск возможного метода лечения.

В определенных иллюстративных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, могут выпускаться для лечения почечного фиброза и ассоциированного острого повреждения почек, а также хронических заболеваний почек, являющихся основными причинами конечной стадии почечной недостаточности.

Специалист в данной области будет способен путем проведения стандартных экспериментов определить, каким должно быть эффективное нетоксичное количество антитела (или дополнительного терапевтического средства) для целей лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с PAI-1. Например, терапевтически активное количество полипептида может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания (например, стадия I в сравнении со стадией IV), возраст, пол, медицинские осложнения

(например, иммунодепрессивные состояния или заболевания) и масса субъекта, а также от способности антитела вызывать желаемый ответ у субъекта. Режим дозирования можно корректировать для получения оптимального терапевтического эффекта. Например, ежедневно можно вводить несколько разделенных доз, или дозу можно пропорционально уменьшить, как указывают требования терапевтической ситуации. Обычно, однако, предполагается, что эффективная доза находится в диапазоне от приблизительно 0,05 до 100 миллиграммов на килограмм массы тела в день и в варианте осуществления от приблизительно 0,5 до 10 миллиграммов на килограмм массы тела в день.

Различные аспекты, раскрытые в данном документе, и варианты их осуществления можно комбинировать друг с другом. В дополнение, любой из аспектов и вариантов их осуществления, описанных выше, можно комбинировать с любым из конкретных аспектов и вариантов осуществления, описанных ниже в данном документе.

Некоторые конкретные аспекты и варианты осуществления, служащие для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, приведены ниже.

ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ АСПЕКТОВ И ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Пункт 1. Выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее:

(a) каркасную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:34, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и

(b) каркасную область легкой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:145, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

Пункт 2. Выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее:

(a) каркасную область тяжелой цепи и переменную область

тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:86, и

(b) каркасную область легкой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:93.

Пункт 3. Выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее:

(a) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную переменной области тяжелой цепи антитела по п. 2, и/или

(b) переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную переменной области легкой цепи антитела по п. 2.

Пункт 4. Выделенное моноклональное антитело, связывающееся по сути с тем же эпитопом, что и антитело по пункту 1.

Пункт 5. Выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее:

(a) каркасную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:34, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:33, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:32; и

(b) каркасную область легкой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:36, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:35.

Пункт 6. Антитело по п. 5, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:6, а переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:7.

Пункт 7. Выделенное моноклональное антитело, связывающееся по сути с тем же эпитопом, что и антитело по пункту 5.

Пункт 8. Гуманизированное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1 человека, где антитело содержит:

(a) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:82, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой

цепи, содержащую SEQ ID NO:91, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(b) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:83, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:92, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(c) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:84, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:93, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(d) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:85, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:91, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(e) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:85, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:93, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(f) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:86, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:94, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(g) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:87, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:95, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(h) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:88, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:96, или ее антигенсвязывающий

фрагмент;

(i) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:89, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:97, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(j) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:90, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:98, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(l) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:86, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:95, или ее антигенсвязывающий фрагмент;

(m) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:89, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:93, или ее антигенсвязывающий фрагмент; или

(n) тяжелую цепь, имеющую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:89, или ее антигенсвязывающий фрагмент, и легкую цепь, имеющую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:95, или ее антигенсвязывающий фрагмент.

Пункт 9. Выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, содержащее:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:22, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:21, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:20; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:25, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:24, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:23,

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1-

тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:63, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:62; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:67, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:66, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:65,

(h) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:70, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:69, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:68; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:73, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:72, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:71; или

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:76, CDR2-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:75, и CDR3-область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:74; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:79, CDR2-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:78, и CDR3-область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:77.

Пункт 10. Выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с PAI-1, которое связывается по сути с тем же эпитопом PAI-1, что и гуманизированное моноклональное антитело по пункту 8 или пункту 9.

Пункт 11. Способ восстановления образования плазмина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно.

Пункт 12. Способ по п. 11, где с помощью способа лечат состояние, включающее повышенные уровни фиброзной ткани.

Пункт 13. Способ по пункту 12, где состояние представляет собой фиброз, фиброз кожи, системный склероз, фиброз легких, идиопатический легочный фиброз, интерстициальное заболевание легких, хроническое заболевание легких, фиброз печени, фиброз почек, хроническое заболевание почек, тромбоз, венозный и артериальный тромбоз, тромбоз глубоких вен, периферическую

ишемию конечностей, тромбоз по типу диссеминированного внутрисосудистого свертывания, острый ишемический инсульт, сопровождающийся и не сопровождающийся тромболизом, или рестеноз в стенте.

Пункт 14. Способ по пунктам 11, 12 или 13, где антитело к PAI-1 включает в себя антитело по любому из предыдущих пунктов.

Пункт 15. Применение фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 для производства лекарственного препарата для лечения состояния, вызываемого повышенными уровнями PAI-1 или повышенной чувствительностью к PAI-1, предусматривающего введение пациенту перорально, парентерально с помощью раствора для инъекций, путем ингаляции или местно.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируют следующие примеры, которые не должны рассматриваться как дополнительное ограничение. Содержание списка последовательностей, фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патент, приведенных в данной заявке, специально включены в данный документ посредством ссылки.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением могут использоваться обычные технологии молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК в пределах компетенции специалиста в данной области. Такие технологии полностью объясняются в литературе. См., например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (в данном документе "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Пример 1: Образование гибридомы: Иммунизация мышей с белком PAI-1 и образование антитела

Были разработаны антитела, которые могут проявлять перекрестную реактивность в отношении активного PAI-1 человека (h) и обезьяны яванского макака (макака-крабоеда) (гликозилированная или негликозилированная форма), и которые могут нейтрализовать ингибиторную активность PAI-1 и восстанавливать последующее образование плазмина, являясь тем самым эффективным терапевтическим средством для лечения почки, печени или фиброза легких или предотвращения образования спаек в брюшной полости и образования келоидных рубцов. Было описано, что нейтрализация ингибиторной функции PAI-1 посредством моноклональных антител включает три механизма: (1) блокирование PAI-1 относительно tPA или uPA посредством стерического препятствия, (2) преобразование PAI-1 в неактивную конформацию, или (3) преобразование PAI-1 в субстратную конформацию.

а) Антигены

PAI-1 выделяется из клеток в активной конформации, стабилизированной посредством его связывания с витронектином при субнаномолярном сродстве. PAI-1 подвергается самопроизвольному конформационному изменению из активной конформации в неактивную конформацию в течение нескольких минут при 37°C и в течение нескольких часов при комнатной температуре. После связывания с витронектином PAI-1 становится более устойчивым к конформационному изменению, что увеличивает период полувыведения PAI-1 в активной конформации от нескольких минут до нескольких часов. Для продления периода полувыведения PAI-1 в активной конформации у иммунизированных животных и для обеспечения возможности иммунной системы мыши распознавать активную конформацию PAI-1, для иммунизаций применяли комплекс витронектина и PAI-1.

Гликозилированный PAI-1 человека, полученный в клетках насекомых, приобретали у Innovative Research (№ по кат. IGLYNPAI-A). Витронектин (№ по кат. IHVN) и tPA (№ по кат. HTPA-TC) также приобретали у Innovative Research. Для получения

иммуногенов PAI-1 инкубировали с витронектином при молярном отношении 1:1 в течение 1 часа при комнатной температуре, или с tPA при молярном отношении 1:1 в течение 15 минут при 37°C. Все иммуногены получали с использованием стерильного физиологического раствора в качестве разбавителя.

б) Иммунизации

Стандартные протоколы получения гибридом, известные из уровня техники, осуществляли для получения антител. В стандартных подходах, ранее описанных в литературе, применяли только PAI-1 или комплекс PAI-1/tPA. Вместо этого авторы настоящего изобретения получали антитела к активной конформации PAI-1. Комплекс PAI-1/витронектин применяли в качестве нового подхода для выработки антител к PAI-1. Для выработки антител применяли стратегию на основе трех способов, изложенную ниже:

(1) классическая иммунизация мышей с использованием комплекса PAI-1/витронектин с получением мышинных спленоцитов для слияния с клеточной линией мышинной миеломы в качестве участника слияния с получением гибридомы;

(2) классическая иммунизация мышей с использованием комплекса PAI-1/tPA с получением мышинных спленоцитов для слияния с клеточной линией мышинной миеломы в качестве участника слияния с получением гибридомы; и

(3) классическая иммунизация мышей с использованием только PAI-1 с получением мышинных спленоцитов для слияния с клеточной линией мышинной миеломы в качестве участника слияния с получением гибридомы.

В исследовании применяли по три мыши на антиген (только PAI-1, комплекс Vn/PAI-1, комплекс tPA/PAI-1). Мыши представляли собой ранее не подвергавшихся воздействию самок мышей BALB/c возрастом 9-20 недель (Charles River, код линии 028). В день 0 девять мышей иммунизировали внутрибрюшинно с использованием только PAI-1, комплексов Vn/PAI-1 или tPA/PAI-1 в фосфатно-солевом буфере (PBS). Всего 10 мкг антигена на мышь смешивали в отношении 1:1 объем/объем с Sigma Adjuvant System (Sigma, кат № 6322) в общем объеме 200 мкл на мышь. В день 14 мышей повторно

иммунизировали с использованием такого же количества антигена, подготовленного тем же способом, что и в день 0. В день 21 собирали образцы крови для оценки титра специфичных антител к PAI-1. У мышей, иммунизированных с использованием комплексов PAI-1/tPA, обнаружили очень низкую специфичную реактивность в отношении PAI-1 и высокие титры к tPA и их не применяли для выполнения последующих слияний.

В день 51 мышей с самым высоким титром специфичного антитела к PAI-1 и самым низким титром в отношении белка, с которым PAI-1 находился в комплексе (т.е. либо Vn, либо tPA), при этом характеризующихся самым высоким титром в отношении мышинных и крысиных ортологов PAI-1, отбирали для выполнения слияния. Мышей, отобранных для выполнения слияния, повторно иммунизировали с использованием только PAI-1 или комплекса PAI-1/Vn в PBS, при этом брали всего 10 мкг антигена на мышь, смешанного в соотношении 1:1 с Sigma Adjuvant System (Sigma, № по кат. 6322) в общем объеме 200 мкл на мышь, как описано выше. В день 55 мышей умерщвляли с использованием камеры CO₂, кровь собирали посредством сердечной пункции и селезенку собирали для получения гибридомы. Остальных четырех мышей подвергали той же процедуре в более позднее время (через 2-4 после того, как первую мышь применяли для выполнения слияния).

Титрования сыворотки проводили для трех мышей относительно только PAI-1 и PAI-1/tPA и для двух мышей относительно PAI-1/Vn с использованием протокола ELISA, описанного в примере 2 (анализ связывания ELISA).

Таблица 3

Сывороточные титры у мышей, иммунизированных с использованием PAI-1, PAI-1/Vn или PAI-1/tPA

Иммуноген	Сывороточный титр антитела к PAI-1 (OD ₄₀₅)			
	№ мыши	OD 1:100	OD 1:1000	OD 1:10000
PAI-1	1	2,1	1,9	1
PAI-1	2	2,1	1,4	1
PAI-1	3	2,0	1,4	1
PAI-1/Vn	2	2,15	1,5	1

PAI-1/Vn	3	1,7	1,25	1
PAI-1/tPA	1	1,2	0,8	0,3
PAI-1/tPA	2	1,3	0,9	0,7
PAI-1/tPA	3	1,3	0,9	0,5
NMS	n/a	0,4	0,12	0,07

NMS=сыворотка нормальной мыши; н/п=не применимо

OD₄₀₅ с использованием устройства BioTek Synergy HT

У мышей, иммунизированных с использованием комплекса PAI-1/tPA, не достигался критерий высокого специфичного титра и их не применяли для выполнения слияний (таблица 3). На основании сывороточных титров, представленных в таблице 3, всего 5 мышей с высоким специфичным титром к PAI-1 отбирали для выполнения слияний.

б) Выполнение слияний

Пять мышей, характеризующихся самым высоким специфичным титром к PAI-1, отбирали для выполнения слияний. В день выполнения слияния мышей умерщвляли в камере с CO₂, кровь собирали посредством сердечной пункции и селезенки удаляли и помещали в чашку Петри, содержащую 10 мл бессывороточной Hybridoma Fusion Medium (IMDM; среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков 500 мл (HyClone SH30259.01)). Спленоциты выдавливали из оболочки, состоящей из фиброзной и эластической ткани, с помощью пинцета и дважды промывали в 10 мл бессывороточной IMDM (в том числе после начального центрифугирования).

Клетки подсчитывали в автоматическом счетчике клеток Countess. Клетки участники слияния (миелома: FO (номер по ATCC CRL-1646)) и спленоциты затем объединяли в одной 50 мл пробирке в соотношении 1:2-1:10 (по числу клеток) и осаждали при 970 об./мин. в течение 10 мин. (медленное центрифугирование) с получением рыхлого осадка. 1 мл предварительно подогретого (при 37°C) PEG (PEG 1500 в 75 mM Hepes 50% вес/объем, Roche кат. № 783641 (10783641001) добавляли капля за каплей к осадку клеток в течение периода времени 1 минута и клетки смешивали после добавления каждой капли PEG. Осадок инкубировали с PEG в течение

еще 1 минуты с последующим добавлением 10 мл бессывороточной среды IMDM в течение 1 минуты, так что первый 1 мл из 10 добавляли в течение 30 с. Клетки подвергали медленному центрифугированию при 970 об./мин. в течение 10 мин. для сохранения жизнеспособности. Слитые клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 200 мкл в селективную среду (200 мл Gibco Hybridoma (SFM № 12045), 20 мл 10% HyClone SuperLow IgG Defined FBS (№ SH30898.03), 2 мл пенициллина/стрептомицина, 4 мл (добавка для слияния и клонирования гибридомы (Roche Diagnostics 11 363 735 001 (50X)) и 4 мл HAT (гипоксантин-аминоптерин-тимидин) (Sigma-Aldrich № H0262 (50X)). Продукты слияния были готовы для скрининга через приблизительно 10-14 дней, или когда среда в лунках становилась желтой. Надосадочные жидкости от продвинутых гибридом затем тестировали с помощью ELISA (пример 2) на наличие антител, связывающихся с PAI-1 и комплексами PAI-1/Vn.

Пример 2: Анализ связывания ELISA для скрининга надосадочной жидкости гибридомы в отношении специфичности к комплексу PAI-1 – витронектин

Каждое слияние на основании селезенок пяти отобранных мышей давало в результате приблизительно 5000 клонов, которые требовали скрининга в отношении связывания с комплексом PAI-1/Vn в качестве первой стадии первичного скрининга. Первичный скрининг надосадочных жидкостей гибридом проводили параллельно с использованием ELISA в отношении либо PAI-1, либо комплексов PAI-1-витронектин для отбора гибридом, специфично связывающихся с PAI-1 в комплексе с витронектином. Материалы, применяемые для ELISA, были следующими: Планшеты Immulon 4 HBX ELISA (Dynax, № по кат. N0541216); мономерный витронектин человека из расчета 5 мкг/мл (Innovative Research, № по кат. IHVN); гликозилированный PAI-1 человека (активная форма) (Molecular Innovations, № по кат. GLYHPAI-A); негликозилированный PAI-1 мыши в некоторых продуктах слияния (Molecular Innovations, № по кат. MPAI-A); вторичное антитело, которое представляло собой конъюгированное с HRP антитело козы к IgG мыши (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs № 115-035-166); и субстрат ABTS: Roche Diagnostics (№ 11 204 521

001).

Применяли следующие контрольные антитела:

- a) 33B8, моноклональное ингибиторное антитело мыши к PAI-1 (IgG1; Innovative Research, № по кат. IMA-33B8);
- b) 33H1, моноклональное ингибиторное антитело мыши к PAI-1 (IgG1; Innovative Research, № по кат. IMA-33H1);
- c) 31C9, моноклональное неингибиторное антитело мыши к PAI-1 (IgG1; Innovative Research, № по кат. IMA-31C9); и
- d) 1B7.11, IgG1 антитело изотипического контроля (mAb к TNF – полученное на месте из клеточной линии гибридомы, приобретенное у ATCC (№ по кат. TIB-191)

Способ ELISA был следующим: планшеты покрывали 5 мкг/мл Vn в PBS в течение ночи при 4°C из расчета 50 мкл/лунка; на следующий день планшеты блокировали 1 час с помощью 200 мкл 1% альбумина бычьей сыворотки в PBS (BSA/PBS); планшеты промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка; активный PAI-1 из расчета 2 мкг/мл в 1% BSA/PBS добавляли в планшеты из расчета 50 мкл/лунка и инкубировали 1 час; планшеты промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка; разведения антитела в 1% BSA/PBS или надосадочные жидкости гибридом из исходных 96-луночных планшетов добавляли в планшеты ELISA из расчета 50 мкл/лунка; планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре (RT); планшеты промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка; добавляли конъюгированное с HRP антитело к IgG мыши из расчета 50 мкл 1:2000 в 1% BSA/PBS и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре; планшеты промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка; в планшеты добавляли субстрат ABTS (одна пилюля, растворенная в 5 мл) из расчета 50 мкл/лунка и затем планшеты считывали на устройстве BioTek Synergy HT с использованием OD₄₀₅. Типичная калибровочная кривая для титрования антитела в анализе связывания ELISA показана на фигуре 2. Антитела 31C9, 33B8 и 33H1 служили в качестве положительных контролей, а IgG1 служил в качестве отрицательного контроля. В таблице 4 показано, что из приблизительно 5000 полученных клонов 675 клонов были положительными в отношении

связывания и с PAI-1, и с PAI-1/Vn. Затем эти клоны подвергали скринингу в отношении сродства с PAI-1.

Таблица 4

Число клонов, положительных в отношении связывания как с PAI-1, так и с PAI-1/Vn

Слияние	Иммуноген	№ мыши	Число клонов, положительных в отношении связывания как с PAI-1, так и с PAI-1/Vn
A	PAI-1/Vn	2	131
B	PAI-1	2	146
C	PAI-1/Vn	3	145
D	PAI-1	3	104
E	PAI-1	1	149

Пример 3: Скрининг надосадочных жидкостей гибридом путем ранжирования сродства с использованием Biacore

Дальнейший отбор антитела с высоким сродством с низкой скоростью диссоциации проводили с использованием Biacore. Скрининг надосадочной жидкости гибридомы с использованием Biacore проводили с помощью одного из двух способов: (1) путем обратного скрининга с использованием иммобилизованных антител к антителу мыши к PAI-1 или (2) путем прямого скринингового анализа с использованием свободного PAI-1 в качестве лиганда или в отношении иммобилизованного Vn.

Применяемые устройства представляли собой BIACORE 2000 или BIACORE 3000 (GE Healthcare), разработанные для анализа биомолекулярного взаимодействия (BIA) в реальном времени. Применяемый сенсорный чип представлял собой чип CM5 (GE Healthcare) с матрицей на основе карбоксиметилированного декстрана на поверхности. Каждый сенсорный чип имеет четыре параллельные проточные ячейки (Fc). С каждой проточной ячейкой связывали mAb к Fc IgG мыши посредством стандартного аминного связывания в соответствии с протоколом производителя для получения чипа.

В обратном скрининговом анализе Biacore положительные в отношении ELISA образцы надосадочной жидкости гибридома выбирали

и фильтровали через 0,2 мкм фильтры перед нанесением на поверхность чипа Biacore. Каждую надосадочную жидкость гибридомы вводили на одну проточную ячейку из проточных ячеек Fc2-Fc4 и IgG в надосадочной жидкости гибридомы захватывался бы на поверхности чипа с помощью mAb к Fc IgG мыши, в то время как Fc1 оставляли в качестве контрольных ячеек. Затем в Fc1-Fc4 вводили белок PAI-1 человека в PBS. Буфер PBS также вводили над поверхностью чипа в качестве контроля. После вычитания сигналов Fc1 и прогонов контрольного буфера сродство связывания (KD)/скорость диссоциации (kd) антитела из надосадочных жидкостей с белком PAI-1 анализировали и ранжировали с использованием программного обеспечения Scrubber 2.

В прямом скрининговом анализе Biacore очищенный белок витронектин человека иммобилизовали на проточных ячейках Fc1-Fc4 чипа CM5. PAI-1 человека или макака-крабоеда захватывался на всех проточных ячейках. Отфильтрованные выбранные образцы надосадочной жидкости гибридомы затем вводили поверх захваченного PAI-1, один на проточную ячейку, за исключением Fc1, которую оставляли в качестве проточной ячейки сравнения. Буфер PBS также вводили над поверхностью чипа в качестве контроля. После вычитания сигналов Fc1 и прогонов контрольного буфера сродство связывания антитела в надосадочной жидкости гибридомы с захваченным витронектином PAI-1 анализировали и ранжировали с использованием программного обеспечения Scrubber 2 (версия 2.0a, 2005; BioLogic Software, BioLogic Software Pty Ltd., 116 Blamey Court, Кэмпбелл, АСТ 2612, Австралия).

В таблице 5 показан отбор положительных и отрицательных клонов антител из слияний А, В, С, D и Е. Показаны не все данные вследствие большого количества клонов антител, подвергнутых скринингу. Только клоны антитела, которые продемонстрировали превосходную ($kd < 10^{-4}$ 1/с) скорость диссоциации связывания против белков PAI-1 человека и макака-крабоеда, выбирали для функционального хромогенного анализа.

Таблица 5

Скрининг сродства/скорости диссоциации при связывании
надосаочных жидкостей гибридом с PAI-1 человека в анализе
Biacore

КЛОН	Связывание с hPAI-1		PAI-1 макака- крабоеда	КЛОН	Связывание с hPAI-1		PAI-1 макака- крабоеда
	Связывание	Скорость вне связи $\leq 10^{-4}$			Связывание	Скорость вне связи $\leq 10^{-4}$	
A9	ND	ND	ND	C26	+	-	-
A20	+	-	-	C45	+	+	+/-
A37	+	-	-	C46	+	+	+
A39	+	+	-	C49	+	+/-	ND
A41	ND	ND	ND	C61	+	+/-	+/-
A44	+	+	+	C66	+	-	-
A47	+	+	+	C69	+	+	+/-
A52	ND	ND	ND	C76	ND	ND	ND
A71	+	+	+	C79	+	-	-
A75	+	+/-	+/-	C85	ND	ND	ND
A83	+	+/-	-	C109	+	-	-
A89	+	+/-	-	C118	+	+/-	ND
A93	+	+/-	-	C134	ND	ND	ND
A98	+	-	-	C145	+	-	+/-
A99	+	+	+/-	D4	-	-	-
A105	+	+	+	D12	+	-	-
A107	+	-	-	D13	-	-	ND
A113	+	+	+	D15	-	-	ND
A119	+	+/-	+/-	D31	+	-	-
B16	ND	ND	ND	D33	+	+/-	-
B18	+	-	-	D37	+	-	-
B28	+	+	-	D48	+	+	+/-
B29	+	-	-	D52	+	+	+
B32	+	+	+	E4	+	+	-
B58	+	+	-	E5	+	+	-
B85	ND	ND	ND	E11	+	+	-
B89	+	+	+/-	E16	+	+	+/-
B99	+	-	+/-	E20	+	ND	ND
B105	+	+	+/-	E21	+	+	-
B109	+	+	+				
B118	ND	ND	ND				

"+"=означает положительное связывание с h/cPAI-1 или скорость диссоциации меньше или равную 10^{-4}

"+/-"= означает частичное связывание с h/cPAI-1 или скорость диссоциации немного выше 10^{-4}

"-"=означает низкое связывание с h/cPAI-1 или его отсутствие или скорость диссоциации выше 10^{-4}

ND=не определено

Пример 4: Функциональный ELISA для скрининга надосадочной жидкости гибридомы для отбора антител, которые блокируют взаимодействие PAI-1 с tPA

Для обеспечения возможности отбора функциональных антител разработали новый ELISA, позволяющий отличать антитела, которые только связываются с PAI-1, и те антитела, которые блокируют функцию PAI-1 в качестве ингибитора tPA (функциональный ELISA).

Надосадочные жидкости гибридом подвергали скринингу в новом функциональном ELISA для идентификации надосадочной жидкости гибридомы от различных клонов, имеющих способность блокировать взаимодействие tPA-PAI-1. Схема функционального ELISA была следующей: (1) если антитело связывается с PAI-1, но связывание антитела не блокирует образование ковалентной связи между PAI-1 и tPA, то антитело к tPA будет связываться с tPA, который связывается с планшетом через PAI-1, и обеспечивает положительную регистрируемую величину; (2) если антитело блокирует PAI-1 и, тем самым, блокирует взаимодействие с tPA либо посредством изменения конформации PAI-1, либо посредством стерического препятствия, то антитело к tPA не будет способным связываться с планшетом и регистрируемая величина будет отрицательной (ниже OD₄₀₅). Помимо этого, надосадочные жидкости гибридом тестировали в отношении связывания с PAI-1 в ELISA, описанном в примере 2. Поскольку количество антитела в надосадочной жидкости гибридомы неизвестно, считали, что показания ниже контрольного (т.е. ниже показаний изотипического контроля) являются идентифицирующими антитело, представляющее интерес. В связи с переменной концентрацией антитела в надосадочной жидкости в некоторых случаях блокирование было только частичным.

Покрытые стрептавидином планшеты (NUNC, № 436014) инкубировали в течение 2 часов при RT с 2 мкг/мл биотин-PAI-1 (PAI-1 человека, с N-концевой биотиновой меткой, активная фракция; Molecular Innovations, № кат. NTBIOPAI-A) в 1% BSA/PBS из расчета 50 мкл/мл. Планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью 200 мкл 1% BSA/PBS при RT и промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка. Разведения очищенного антитела и надосадочные жидкости гибридом добавляли в лунки из расчета 50 мкл/лунка и инкубировали в течение 15 минут. Планшеты промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка. Двухцепочечный tPA (Innovative Research, № по кат. НТРА-ТС) при 1 мкг/мл добавляли в планшеты из расчета 50 мкл/лунка и инкубировали в течение 30 минут при RT. Планшеты промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка. В планшеты добавляли конъюгированное с HRP антитело к tPA (Life Span Technologies, № по кат. LS-C39721) при разведении 1:3000 и инкубировали в течение 45 минут. Планшеты промывали четыре раза PBS из расчета 200 мкл/лунка. В планшеты добавляли субстрат ABTS (одна таблетка, растворенная в 5 мл; Roche Diagnostics № 11 204 521 001) из расчета 50 мкл/лунка и оставляли на срок, необходимый для проявления цвета. Планшеты считывали на устройстве BioTek Synergy HT с использованием OD₄₀₅. Значения OD, которые были ниже, чем у IgG изотипического контроля, указывают на блокирование связывания tPA с PAI-1.

В некоторых случаях функциональный ELISA проводили перед скринингом надосадочной жидкости с помощью Biacore и он служил в качестве стадии отбора, которая была более важной для разработки гибридомы. Иллюстративная кривая с 33H1 в качестве положительного контроля, IgG1 в качестве отрицательного контроля и A44 в качестве идентифицированного положительного клона антитела показана на фигуре 3.

Таблица 6

Функциональный ELISA для скрининга надосадочной жидкости
гибридомы для отбора антител, которые блокируют взаимодействие
PAI-1 с tPA

КЛОН	PAI-1 ELISA	Ингибирование связывания tPA/PAI-1	Отбирали	КЛОН	PAI-1 ELISA	Ингибирование связывания tPA/PAI-1	Отбирали
A9	+	-	нет	C26	+	+	да
A20	+	-	нет	C45	+	+	да
A37	+	+	да	C46	+	-	нет
A39	+	+/-	да	C49	+	-	нет
A41	+	+	да	C61	+	+	да
A44	+	+	да	C66	+	+	да
A47	+	+	да	C69	+	+	да
A52	+	-	нет	C76	+	-	нет
A71	+	+	да	C79	+	+	да
A73	+	-	нет	C85	+	-	нет
A75	+	+	да	C109	+	+	да
A83	+	+	да	C118	+	+	да
A89	+	+	да	C134	+	-	нет
A93	+	-	нет	C145	+	+	да
A98	+	+	да	D4	+	-	нет
A99	+	-	нет	D12	+	+	да
A105	+	+	да	D13	+	+	да
A107	+	+	да	D15	+	+	да
A113	+	+	да	D31	+	+	да
A119	+	+	да	D33	+	+	да
B16	+	-	нет	D37	+	+	да
B18	+	+	да	D44	+	+	да
B28	+	+/-	да	D47	+	+	да
B29	+	+	да	D48	+	+	да
B32	+	+	да	D52	+	+	да
B58	+	+	да	D55	+	+	да
B85	+	-	нет	E4	+	-	нет

B89	+	+	да	E5	+	-	нет
B99	+	+	да	E11	+	+	да
B105	+	+	да	E16	+	+	да
B109	+	+	да	E20	+	-	нет
B118	+	+	да	E21	+	+	да

PAI-1 ELISA="+" означает связывание с PAI-1 (см. пример 2)

Ингибирование связывания tPA/PAI-1=балл "+" означает, что взаимодействие tPA с PAI-1 ингибируется; +/-=частичное ингибирование взаимодействия tPA с PAI-1

Скринингу подвергали более 200 надосадочных жидкостей. В таблице 6 показан отбор положительных и отрицательных надосадочных жидкостей гибридом. Приблизительно по 10 гибридом на слияние демонстрировали способность блокировать PAI-1 от связывания с tPA в функциональном ELISA. Исходя из данных, полученных на основании надосадочных жидкостей гибридом, отбирали гибридомы для секвенирования и среднего уровня выработки антител. Даже несмотря на то, что D4 не связывался в достаточной степени с негликозилированным PAI-1, его отобрали для очистки и секвенирования, исходя из его связывания в Biacore с гликозилированным PAI-1. Очищенные антитела подвергали дополнительному определению характеристик с помощью Biacore в отношении кинетики сродства, а также при помощи хромогенного и клеточного анализов для определения эффективности по сравнению с коммерчески доступными антителами.

Пример 5: Секвенирование с помощью 5'-RACE (быстрая амплификация концов кДНК) и очистка мышинного антитела

Антитела для специфической мишени, полученные из серии слияний, могут иметь одинаковые последовательности. При проведении секвенирования гена антитела на ранней стадии получения антитела исключали любые возможные избыточные антитела и правильные последовательности гена антитела направляли отбор и гуманизацию антител, а также конструирование химерного антитела.

5'-RACE представляет собой процедуру для амплификации последовательностей нуклеиновых кислот из шаблона матричной РНК между определенным внутренним сайтом и неизвестными

последовательностями на 3'- или 5'-конце мРНК. Данная методика амплификации со специфичностью к одной стороне была описана как "односторонняя" ПЦР или "заякоренная" ПЦР. Исходную последовательность вариабельной области мышиногo антитела к РА1-1 человека лидерного антитела определяли с помощью секвенирования кДНК 5'-RACE и подтверждали с помощью секвенирования N-конца белка.

Для определения последовательностей вариабельных областей тяжелой (VH) и легкой цепи (VL) IgG общую РНК из клеток гибридомы выделяли с использованием RNeasy Mini Kit (QIAGEN, № по кат. 74104) согласно инструкциям производителя. Кратко, клетки (5×10⁶ клеток) лизировали в 350 мкл буфера RLT из набора с последующим захватом общих РНК на центрифужной колонке. РНК элюировали в буфер TE из набора и хранили на льду.

кДНК первой нити получали с использованием набора для амплификации кДНК SMARTer™ RACE (ClonTech, № по кат. 634923). Протокол 5'-RACE осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. кДНК VH и VL цепей амплифицировали отдельно путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием 5'-праймеров, поставляемых в наборе SMARTer™, и VH- и VL-ген-специфичных 3'-праймеров, перечисленных ниже:

3'-праймер тяжелой цепи: 5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA -3' (SEQ ID NO: 105)

3'-праймер легкой цепи: 5'-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAG -3' (SEQ ID NO:106)

Амплифицированные гены VH и VL отдельно клонировали в вектор ТОРО с использованием набора для клонирования ТОРО ТА (Invitrogen, № по кат. K4520-01). Процедуры осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Для трансформации бактерий реакционные смеси добавляли в компетентные клетки E. coli и инкубировали на льду в течение 20 минут. Пробирки, содержавшие клетки E. coli и реакционную смесь, нагревали при 42°C в течение 40 секунд и добавляли 250 микролитров среды SOC из набора. После инкубации E. coli при 37°C в течение 60 минут при встряхивании со скоростью 300 об./мин. бактерии наносили на

чашку с агаровой средой LB, содержащей 100 микрограмм на мл ампицилина с последующей инкубацией при 37°C в течение ночи.

После подтверждения встраивания гена VH и VL с помощью ПЦР отбирали по пять клонов бактерий и размножали в бульоне LB, содержащем 100 микрограмм на мл ампицилина для получения плазмидной ДНК. Плазмидные ДНК выделяли с использованием набора QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, № по кат. 27104) в соответствии с инструкциями производителя. Гены VH и VL IgG из гибридом секвенировали способом Сэнгера, а CDR определяли с использованием контактного определения (MacCallum *et al.*).

Моноклональные антитела получали в биореакторных флаконах CELLline (Wilson Wolf Manufacturing Corp.; кат. № CL350 или кат. № CL1000) согласно инструкциями производителя в бессывороточной среде (Gibco, кат. № 12045) и очищали путем хроматографии с белками A/G (GE Healthcare Life Sciences, кат. № 28-4083-47 и № 28-4082-53). Очищенные антитела подвергали дополнительному определению характеристик с помощью Biacore в отношении кинетики сродства, а также при помощи хромогенного и клеточного анализов для определения эффективности по сравнению с коммерчески доступными антителами.

Пример 6: Функциональный хромогенный анализ с использованием очищенного антитела

Очищенные антитела тестировали в хромогенном анализе в отношении способности блокировать PAI-1. PAI-1 ингибирует функцию tPA, следовательно, антитела, которые блокируют PAI-1, будут приводить к восстановлению функции tPA. В хромогенных анализах используют протеолитические ферменты, которые воздействуют на свои естественные субстраты (белки и пептиды) путем гидролиза одной или нескольких пептидных связей. Данный процесс, как правило, является высокоспецифичным в том смысле, что расщепляются только пептидные связи, примыкающие к определенным аминокислотам. Хромогенные субстраты представляют собой пептиды, которые вступают в реакцию с протеолитическими ферментами, что приводит к образованию цвета, который определяют количественно. Хромогенные субстраты получают синтетическим

путем, и они разработаны так, чтобы обладать селективностью, подобной селективности естественного субстрата для фермента. К пептидной части хромогенного субстрата прикреплена химическая группа, которая при высвобождении после расщепления фермента приводит к возникновению цвета. Изменение цвета можно отслеживать при помощи спектрофотометрии, и оно пропорционально протеолитической активности.

Хромогенный анализ применяли для подтверждения способности антитела нейтрализовать функцию PAI-1 в качестве ингибитора tPA. tPA способен высвобождать pNA из хромогенного субстрата S2288. S228 в растворе не имеет цвета, но после воздействия tPA и последующего высвобождения pNA раствор приобретает желтый цвет, который можно считывать при OD₄₀₅. Образование цвета можно наблюдать через 2-3 часа для определения кинетики ферментативной реакции. PAI-1 способен блокировать ферментативную активность tPA в зависимости от концентрации.

Проводили двухстадийный хромогенный анализ. Все реагенты имели 10x концентрацию вплоть до той стадии, когда их добавляли в раствор субстрата. На первой стадии эффективность PAI-1 в ингибировании tPA измеряли с использованием хромогенного анализа (титрование PAI-1 при постоянной концентрации tPA). Титрационную кривую PAI-1 анализировали для определения IC₅₀ для PAI-1, блокирующего активность tPA. После этого IC₈₀, рассчитанную на основании кривой, выбирали для дальнейшей проверки антитела в отношении способности нейтрализовать блокирующую функцию PAI-1 и восстанавливать ферментативную активность tPA. Равные объемы (25 мкл) tPA (из расчета 14 нМ) (Innovative Research, кат. № INTPA-TC) и гликозилированного (активная форма) PAI-1 человека (Molecular Innovations, кат. № GLYNPAI-A) или негликозилированного (активная форма) PAI-1 мыши (Molecular Innovations, кат. № IMPAI) объединяли и инкубировали с использованием 3-кратных серийных разведений PAI-1, начиная от 108 нМ, и постоянной концентрации tPA. Все разведения белка проводили с помощью 1% BSA/PBS. Смесь инкубировали в лунках 96-луночного титрационного микропланшета в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем 200 мкл хромогенного субстрата

S2288 (1,25 мМ) (Chromogenix, кат. № S-820852), разведенного согласно инструкциям производителя, добавляли в лунки и изменение поглощения OD₄₀₅ при 405 нм регистрировали в течение 2 часов через каждые 10 минут для измерения остаточной активности tPA. Что касается контролей, фоновый уровень измеряли в отсутствие tPA (ферментативная реакция отсутствует), положительным контролем служило отсутствие PAI-1 (100% активность tPA), и отрицательным контролем служил PAI-1 при 10-кратном избытке по отношению к tPA (полное блокирование активности tPA). См. фигуру 4 относительно иллюстративных кривых для 33B8, A44, 33H1 и IgG1.

Что касается второй стадии, функциональные свойства антител определяли путем оценки их способности ингибировать активный PAI-1 и восстанавливать функцию tPA при использовании анализа нейтрализации PAI-1. Что касается данной стадии, 12,5 мкл активного PAI-1 (при 56 нМ) инкубировали с равным объемом либо PBS (Invitrogen, кат. № 14190-144), содержащего 1% BSA (Sigma, кат. № A3059), либо с серийными 3-кратными разведениями антитела, начиная от 2 мкМ. Контрольные и неизвестные антитела инкубировали при концентрациях (5-кратные разведения) в диапазоне от 0,1 до 300 нМ с 3 нМ PAI-1 и в смесь добавляли tPA. Все ингредиенты инкубировали из расчета 10х концентрации при комнатной температуре и дополнительно 10-кратно разводили субстратом S2288 для tPA, который после расщепления с помощью tPA меняет цвет с прозрачного на желтый. Образцы считывали при OD 405 в течение 2 часов через каждые 10 минут при 37°C. Обеспечивали возможность прохождения реакции в смеси в лунках 96-луночного титрационного микропланшета в течение 30 минут при комнатной температуре для достижения образования комплекса антитело-антиген. Затем в лунки добавляли 25 мкл tPA (при 14 нМ, что соответствует IC₈₀ ингибирования активности tPA) и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Наконец, в смесь добавляли 200 мкл 1,25 мМ субстрата S2288, разведенного согласно инструкциям производителя. Изменение поглощения при 405 нм регистрировали в течение 2 часов через

каждые 10 минут для измерения остаточной активности tPA. Стопроцентную активность PAI-1 определяли как активность PAI-1, наблюдаемую в отсутствии антитела. Нейтрализацию активности PAI-1 при помощи антитела рассчитывали, исходя из остаточной активности PAI-1, измеренной в присутствии антитела. Контроли представляли собой IgG1 в качестве изотипического контроля (отрицательного) и mAb 33H1 и mAb 33B8 в качестве положительных контролей. См. фигуру 5 относительно иллюстративных кривых для B28, E16, E21, A75 и IgG1.

Ортологи PAI-1 человека, ингибирующие tPA человека, тестировали в системе двухстадийного хромогенного анализа. Титрование ортологов проводили, как описано выше, для PAI-1 человека (см. фигуру 6 относительно иллюстративных кривых титрований) и активность tPA определяли хромогенным способом (см. фигуру 7 относительно иллюстративных кривых для 33B8 и A44 в отношении PAI-1 макака-крабоведа и мыши). Конечная концентрация tPA человека, применяемая в анализе, составляла 1,4 нМ. 12,5 мкл активного PAI-1 (56 нМ) инкубировали с равным объемом либо PBS, содержащего 1% BSA, либо с серийными 3-кратными разведениями антитела, начиная с 2 мкМ. Обеспечивали возможность прохождения реакции в смеси в лунках 96-луночного титрационного микропланшета в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем в лунки добавляли по 25 мкл tPA (14 нМ) и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Для завершения реакции в смесь добавляли 200 мкл субстрата S2288 для tPA (Chromogenix) (1,25 мМ). Ортолог PAI-1 получали от Molecular Innovations: PAI-1 мыши (активная фракция белка дикого типа; № по кат. MPAI); PAI-1 крысы (активная фракция белка дикого типа; № по кат. RPAI); а PAI-1 кролика (стабильный мутант; № по кат. RbPAI-I91L) и PAI-1 макака-крабоведа (активный PAI-1 макака-крабоведа) получали на месте с помощью *E.coli*. Из-за низких скоростей диссоциации ортологов кролика и крысы в скрининге с помощью Biacore (данные не показаны), скрининг антител к данным ортологам не проводили.

Таблица 7

Активность антител к ортологам и состояние гликозилирования PAI-1 в функциональном хромогенном анализе

ID клона	Изотип	Ортолог PAI-1 и состояние гликозилирования			
		негликозилированный hPAI-1	гликозилированный hPAI-1	негликозилированный сPAI-1	негликозилированный mPAI-1
A37	IgG1	+/-	-	-	-
A39	IgG1	-	+++	-	-
A41	IgG1	+/-	-	-	-
A44	IgG1	+++	+++	+++	-
A47	IgG1	nd	-	-	-
A71	IgG1	+++	+++	+++	-
A75	IgG2a	+++	+++	+++	-
A83	IgG1	nd	+/-	+/-	-
A89	IgG2b	-	-	-	-
A98	IgG1	nd	nd	nd	nd
A105	IgG1	+++	+++	+++	-
A107	IgG1	+/-	-	-	-
A113	IgG1	-	-	-	-
A119	IgG2a	-	-	-	-
B18	IgG1	+	+	+	-
B28	IgG2b	-	+++	-	-
B29	IgG1	-	-	-	-
B32	IgG1	nd	-	-	-
B58	IgG1	nd	+	+	-
B89	IgG1	nd	-	-	-
B99	IgG2a	nd	+	+	-
B105	IgG1	-	-	-	-
B109	IgG1	+++	+++	+++	-
B118	IgG1	+	+	+	-
C26	IgG1	++	++	++	+
C45	IgG2b	+++	+++	+++	-
C61	IgG1	+	+	+	-
C66	IgG1	+	+	+	-
C69	IgG1	++	++	++	-
C79	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C109	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C118	IgG1	++	++	++	-
C145	IgG2b	++	++	++	-

D4	IgG2a	+	++	+	-
D12	IgG1	+	+	+	-
D13	IgG1	-	-	-	-
D15	IgG1	+	+	+	-
D31	IgG1	++	++	++	-
D33	IgG1	-	-	-	-
D37	IgG2a	-	-	-	-
D48	IgG2a	-	+/-	-	-
D52	IgG1	+	+	+	-
E11	IgG1	++	++	++	-
E16	IgG1	+++	+++	+++	-
E21	IgG2b	+++	+++	+++	-

h=человек, с=обезьяна яванский макак (крабоед), m=мышь, nd=не определено

“-“=активность отсутствует, “+/-“=частичная активность’ “+“=слабая активность, “++“=умеренная активность, “+++“=сильная активность

В данном анализе одно или несколько антител из каждого слияния демонстрировали способность блокировать ингибиторную функцию PAI-1 как макака-крабоеда, так и человека, при этом приблизительно 14 антител характеризовались блокирующей активностью от умеренной до сильной. A39 и B28 имели уникальный профиль, заключающийся в том, что эти два антитела блокировали гликозилированный hPAI-1, но не обладали активностью в отношении негликозилированного PAI-1 человека или макака-крабоеда. Ни одно из антител не обладало способностью эффективно блокировать активность PAI-1 мыши (в пределах 10-кратного значения по сравнению с PAI-1 человека), за исключением C26.

Пример 7: Механизм действия моноклональных антител

Моноклональные антитела могут ингибировать PAI-1 посредством трех различных механизмов: а) посредством стерического препятствия, б) посредством превращения PAI-1 в неактивную конформацию после связывания, и с) посредством превращения PAI-1 в конформацию субстрата для tPA вместо ингибитора (“субстратная конформация”). PAI-1 образует ковалентную связь с tPA при взаимодействии с сериновой протеазой.

Хромогенный анализ и методики SDS-PAGE применяли для идентификации механизма действия антитела. Реакцию между

моноклональным антителом (или контрольными антителами), PAI-1 и tPA осуществляли, как описано выше для функционального хроматографического анализа. Образцы смешивали с буфером для образцов Laemmli и загружали в гель SDS-PAGE в невозмущающих условиях и прогоняли в течение 30 минут. В дальнейшем гели окрашивали Кумасси синим для визуализации белков, комплексов и расщепленной формы PAI-1. Контрольные моноклональные антитела с известным механизмом действия применяли для сравнения. Как известно, 33B8 превращает PAI-1 в неактивную конформацию, а 33H1, как известно, превращает PAI-1 в субстратную конформацию. В данном анализе возможно точно определить субстратную конформацию, но невозможно различать неактивную конформацию или стерическое препятствие. Иллюстративные SDS-гели показаны на фигурах 8, 9 и 10.

Таблица 8

Механизм действия моноклональных антител

Антитело	Механизм действия
A44	превращает PAI-1 из активной → субстратную конформацию
C26	превращает PAI-1 из активной → субстратную конформацию
C45	превращает PAI-1 из активной → субстратную конформацию
E21	превращает PAI-1 из активной → субстратную конформацию
A39	превращает PAI-1 из активной → неактивную конформацию или создает стерическое препятствие
B109	превращает PAI-1 из активной → неактивную конформацию или создает стерическое препятствие
E16	превращает PAI-1 из активной → неактивную конформацию или создает стерическое препятствие

A44, C26, C45 и E21 блокируют активность PAI-1 путем превращения PAI-1 из активной конформации в субстратную конформацию. A39 и B109 имеют различный механизм действия, но в ходе анализа невозможно отличить, блокируют ли данные антитела активность PAI-1 путем изменения PAI-1 из активной конформации в неактивную конформацию или посредством создания стерического препятствия.

Пример 8: Кинетика связывания очищенного антитела

При измерении кинетики антитела оценивали в обратном анализе при 25°C. В обратном анализе антитела к PAI-1 захватывались поверхностью с антителами к Fc IgG мыши, полученной на чипе CM5, с последующим введением серийных 2х разведений белков PAI-1 (человека или макака-крабоеда), начиная от 40 нМ. Высокую скорость потока выбирали из расчета 50 мкл/мин во избежание ограничения переноса масс. Предусматривали время диссоциации, составляющее две тысячи секунд, для приспособления к низкой скорости диссоциации отобранных антител. Чип регенерировали с помощью буфера глицин-HCl, pH 1,7, после каждого цикла связывания антитело-PAI-1. Анализ данных кинетики проводили с использованием Biacore BIAevaluation. Сенсограммы подвергали процедуре двойного контроля путем вычитания значений контрольной проточной ячейки и значений контрольного буфера. Сенсограммы аппроксимировали с применением имитационной 1:1 модели кинетики (Лэнгмюра) с локальным Rmax. Данные для тестируемых антител показаны ниже в таблице 9.

Таблица 9

Кинетика связывания с помощью обратного анализа Biacore

Антитело	PAI-1 человека		PAI-1 макака-крабоеда	
	Скорость диссоциации kd (1/с)	Сродство KD (M)	Скорость диссоциации kd (1/с)	Сродство KD (M)
A39	7,09E-05	1,16E-11	ND	ND
A44	1,49E-05	3,76E-12	<=1,0E-6	<=1,0E-13
A75	4,76E-04	1,20E-10	ND	ND
A105	1,64E-04	4,23E-11	ND	ND
B28	4,61E-04	6,5E-10	ND	ND

ND=не определено

Кинетику связывания иллюстративных антител дополнительно анализировали и сравнивали в прямом анализе Biacore с комплексом витронектина и PAI-1. В прямом анализе белок витронектин человека иммобилизовали на чипе CM5 в проточных ячейках Fc1-Fc4 посредством аминного связывания. PAI-1 человека затем

захватывался поверхностью с витронектином в проточных ячейках Fc2-Fc4 в качестве лиганда. Fc1 выступала в качестве контрольной ячейки. Антитела разводили 2х, начиная от 40 нМ, и вводили в Fc1-4. Анализ данных кинетики проводили с использованием Biacore BIAevaluation. Вначале сенсограммы подвергали процедуре двойного контроля путем вычитания значений контрольной ячейки и значений контрольного буфера, а затем аппроксимировали с помощью 1:1 модели (Лэнгмюра), которую применяли с глобальным Rmax.

Таблица 10

Кинетика связывания A44 с захваченным витронектином человека
PAI-1 человека в прямом анализе Biacore

Связывание A44 с Vn-захваченным	kd (1/с)	KD (M)
hPAI-1	$\leq 1,0E-6$	$\leq 1,0E-12$

Данные в таблице 10 указывают на то, что A44 связывает свободный PAI-1 человека, а также PAI-1 в комплексе с витронектином.

Пример 9: Функциональный анализ на первичных клетках человека

Для дополнительного изучения способности каждого антитела восстанавливать последующее образование плазмينا в первичных клетках человека применяли анализ образования плазмينا. Для тестирования в данном анализе применяли только антитела, которые продемонстрировали высокую эффективность в хромогенном анализе и хорошее сродство в анализе Biacore.

В день 1 первичные звездчатые клетки печени человека (Sciencell CA, № по кат. SC5300) высевали из расчета 20000 клеток/лунка в минимальной среде (DMEM Gibco+glutamax-1 4,5 г/л D-глюкоза, пируват (31966-021), 0,2% фетальной бычьей сыворотки gold PAA (A11-152)) при 37°C в 5% CO₂. В день 2 для нейтрализации активности PAI-1 антитела предварительно инкубировали с рекомбинантным PAI-1 (Molecular Innovation, № по кат. IGLYHPAI-A, рекомбинантный гликозилированный PAI-1 человека, конечная концентрация 5 нМ) в течение 15 минут при комнатной температуре. В то же самое время tPA (Molecular Innovations (№ по кат. HTPA-TC), 5 нМ в DMEM без фенолового красного) инкубировали с

клетками в течение 15 минут при 37°C. После отмывки несвязанного tPA смеси PAI-1/mAb добавляли к клеткам и затем измеряли остаточную активность tPA путем добавления смеси глутамин-плазминоген/субстрат (Glu-Pg: Sigma, № по кат. 9001-91-6; конечная концентрация 0,5 мкМ) и хромогенного субстрата для плазмина: (CBS00.65 Stago, № по кат. 00128, конечная концентрация 0,5 мМ).

Активацию плазминогена до плазмина определяют путем считывания кинетики через каждые 45 секунд при 405/492 нм с использованием спектрофотометра (IEMS, Thermofisher), термостатированного при 37°C. С помощью программного обеспечения Biolise (Thermofischer) рассчитывали максимальную скорость расщепления хромогенного субстрата: образования плазмина, выраженную как V_{max}: рассчитанная максимальная скорость при 405/492 нм в минуту (mDO/мин.). Затем рассчитывали ингибирование PAI-1 с применением в качестве контроля tPA отдельно (100% ингибирование) и PAI-1 (без mAb, в качестве отсутствия ингибирования) и наносили на график с использованием программного обеспечения Biostat speed для расчета IC₅₀ и I_{max}.

Таблица 11

Образование плазминогена в первичных звездчатых клетках печени человека

Антитело	Среднее значение IC ₅₀ abs ± sem (нМ)	Среднее значение I _{max} (%)	n
A44	3,32±0,34	97	7
A39	5,4±0,8	99	3
A71	8,61±3,6	90	3
A75	22,6±8,2	66	4
A105	27±7,8	88	3
B28	7,28±2,7	90	3
B109	6,11±0,88	94	3
C26	Неактивный	n/a	2
C45	6,5±1,11	97	4

E16	4,74±2,27	95	3
E21	Неактивный	n/a	3
33H1	22,92±12	56	3
33B8	Неактивный	n/a	3

n/a=не применимо

Пример 10: Поиск эпитопа для связывания антителом с помощью конкурентного анализа Biacore

Выбранную группу антител к PAI-1 с превосходными активностями связывания и блокирования исследовали в отношении их потенциальных эпитопов для связывания в конкурентном анализе Biacore. В анализах вновь выявленные антитела, а также несколько коммерчески доступных антител к PAI-1 с известным сайтом связывания на PAI-1 человека подбирали для проведения анализа конкуренции за связывание с белком PAI-1 человека. Каждое антитело иммобилизовали на проточной ячейке в чипе CM5 Biacore с использованием стандартной реакции аминного связывания. Все тестируемые антитела, за исключением клона B28, сохраняли активность сайта связывания после аминного связывания. Белок PAI-1 человека захватывался иммобилизованным антителом на чипе с последующим введением каждого антитела в качестве анализируемого вещества. Только анализируемые антитела, имеющие сайты связывания на PAI-1 человека, отличающиеся от таковых иммобилизованного антитела, будут демонстрировать дополнительные сигналы связывания в Biacore. Эксперименты с анализом конкуренции повторяли дважды для каждого иммобилизованного антитела, и результаты показаны в следующей таблице.

Таблица 12

Сводная информация по эпитопам для связывания на основании конкурентного анализа Biacore

	Анализируемое антитело												
		33H1	33B8	A44	31C9	A71	A75	B109	B28	C45	C26	E16	E21
Иммобилизованное антитело	33H1	c/c	b/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/c
	33B8	b/b	c/c	b/b	b/c	b/b	b/b	b/b	p/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	A44	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	c/c	b/b
	31C9	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	A71	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	A75	b/b	p/p	b/b	p/p	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	B109	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/c	b/b
	B28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C45	b/b	p/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b
	C26	b/c	p/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/c	b/b	c/c	b/b	c/c
	E16	b/b	p/b	b/c	b/b	b/b	p/b	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	b/b
	E21	b/c	b/c	b/b	b/c	b/c	b/b	b/b	b/c	b/b	b/c	b/b	c/c

p=частичное связывание анализируемым антителом, c=конкуренция с анализируемым антителом, b=связывание анализируемым антителом; " - " = отсутствие связывания PAI-1 с иммобилизованным антителом; nt=не тестировали

Если A44 является иммобилизованным и связывает PAI-1, C45 (анализируемое антитело) не способно связываться с PAI-1, который связан посредством A44. Следовательно, C45 конкурирует за тот же сайт связывания, посредством которого A44 связывается на PAI-1 (обозначено в таблице 12 как "c/c") или связывание A44 с PAI-1 препятствует связыванию C45 с PAI-1. Данный анализ подтверждается, если эксперимент повторяют в обратном порядке. А именно, если C45 является иммобилизованным антителом и связано с PAI-1, A44 в качестве анализируемого антитела не способно связывать PAI-1, который связан с C45 (обозначено в таблице 12 как "c/c"). В подобном анализе A71 и A75 конкурируют за тот же сайт на PAI-1. Анализ Biacore подтвердил, что A44 и C45, а также A71 и A75 конкурируют или препятствуют друг другу при связывании с PAI-1.

Напротив, коммерчески доступные антитела, 33Н1 и 33В8, не конкурируют с А44. Если А44 является иммобилизованным антителом и связано с РАІ-1, оба 33Н1 и 33В8 все еще способны связываться с РАІ-1, который связан с А44 (обозначено как "b/b" в таблице 12). Это подтверждается в обратном эксперименте. Если РАІ-1 связано с иммобилизованным 33Н1 или иммобилизованным 33В8, А44 все еще способно связываться с РАІ-1. Таким образом, коммерческие антитела 33Н1 и 33В8 не конкурируют или не препятствуют связыванию А44 с РАІ-1.

Что интересно, некоторые иммобилизованные антитела (т.е. В109) блокировали анализируемое антитело (т.е. 33В8) от связывания с захваченным белком РАІ-1; но при смене положения иммобилизованного антитела на анализируемое антитело (например, переворачивании пары на чипе), пара антител больше не конкурирует между собой за связывание с РАІ-1. Например, если В109 представляло собой иммобилизованное антитело, связанное с РАІ-1, 33В8 было неспособно связывать РАІ-1. Однако, если 33В8 представляло собой иммобилизованное антитело, связывающее РАІ-1, В109 было способно связывать РАІ-1. Одно возможное объяснение этого результата является следующим, если иммобилизованное антитело связано с РАІ-1, РАІ-1 может переходить в конформацию, неблагоприятную для второго или анализируемого антитела и препятствовать связыванию анализируемого антитела (к примеру, если В109 представляет собой иммобилизованное антитело, а 33В8 представляет собой анализируемое антитело). Однако, когда пару антител обращают, иммобилизованное антитело может связываться таким образом, что конформация РАІ-1 практически не меняется, тем самым, обеспечивается возможность связывания анализируемого антитела со связанным РАІ-1 (т.е. анализируемое антитело В109 способно связывать РАІ-1, который связан иммобилизованным антителом 33В8). Следовательно, конкуренция, наблюдаемая между 33В8 и В109, обусловлена не перекрыванием сайтов связывания на РАІ-1, а, вероятно, обусловлена конформационным изменением в РАІ-1 при связывании с В109.

Другим интересным наблюдением было то, что потеря связывания В28 с РАІ-1 человека при иммобилизации посредством

аминного связывания, что позволяет предположить, что CDR-области B28 включают аминокислоты с первичной аминогруппой(ами).

Пример 11: Отбор моноклонального антитела мыши для гуманизации

В таблице 13 показана сводная информация *in vitro* данных, характеризующих наиболее активные моноклональные антитела из пяти проведенных слияний. Исходя из этих данных, A44 отбирали для гуманизации, поскольку A44 представляло собой наиболее эффективное антитело в хромогенном анализе и в образовании плазмина, при этом имеет наибольшее сродство в анализе Biacore.

Таблица 13

Сводная информация по сродству и эффективности моноклональных антител в отношении гликозилированного PAI-1 человека

Антитело	Хромогенные анализы (нМ)	Образование плазмина (нМ)	Kd сродства (М)	Механизм действия
A39 (IgG1/k)	1,70, 1,00	5,4	1,16E-11	SH или неактивная
A44 (IgG1/k)	1,66, 1,50, 1,70	3,32	4,20E-14	Субстрат
A71 (IgG1/k)	Примерно 4,00	8,61	ND	SH или неактивная
A75 (IgG2a/k)	3,00	22,6	1,20E-10	SH или неактивная
A105 (IgG1/k)	7,00	27,0	4,20E-11	SH или неактивная
B28 (IgG2b/k)	1,80	7,28	6,5E-10	SH или неактивная
B109 (IgG1/k)	0,23	6,11	ND	SH или неактивная
C26 (IgG1/k)	5,00	Неактивный	ND	Субстрат
C45 (IgG2b)	0,5	10,6	ND	Субстрат
E16 (IgG1)	1,1	4,74	ND	SH или неактивная
E21 (IgG2b)	1,3	216,0	ND	Субстрат

SH=стерическое препятствие; ND=не определено

Последовательности тяжелой и легкой цепи, показанные в таблице 1, выровнены на фигуре 12 и CDR, определенные с помощью IMGT, выделены жирным шрифтом. Исходя из *in vitro* данных, представленных в таблице 13, для гуманизации отобрали A44.

Пример 12: Конструирование Fab антитела A44 к PAI-1: гуманизация, стабилизация и мутирование нежелательных мотивов последовательности

Несколько подходов, обсуждаемых ниже, применяли для гуманизации, стабилизации и оптимизации мотивов последовательности антитела A44 мыши к PAI-1.

1) Гуманизация

Применяемый протокол гуманизация был описан в PCT/US08/74381 (US20110027266), включенной в данный документ посредством ссылки во всей полноте. Последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) и вариабельной области тяжелой цепи (VH) A44 мыши применяли для построения гомологичной модели легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC) антитела A44 к PAI-1 в Molecular Operating Environment (МОЕ; v. 2010.10; Chemical Computing Group). Применяли следующие шаблоны: каркасная область легкой цепи – 1D5I (94% идентичность в каркасных областях), каркасная область тяжелой цепи – 3KSO (96% идентичность в каркасных областях), L1-1D5I (94% идентичность), L2-1D5I (94% идентичность), L3-1AXS (72% идентичность), H1-1IC7 (82% идентичность), H2-1MBU (68% идентичность) и H3-2WDB (62% идентичность). H3-петлю было особенно тяжело моделировать, поскольку первым остатком является Trp. 2WDB, хотя является более короткой петлей, также несет Trp в начале петли и такую же последовательность Phe-Asp-Tyr на конце H3-петли. Боковые цепи с Glu-105 (LC) и His-99 воссоздавали и последующую модель строили с использованием способа минимизации энергии при помощи стандартных процедур, реализованных в МОЕ. Затем осуществляли моделирование молекулярной динамики (MD) минимизированной 3D гомологичной модели A44 мыши, с ограничениями относительно остова белка при температуре 500K в течение 1,1 наносекунд (нс) с неявным растворителем Generalized Born. Десять различных

конформаций получили из этого первого прогона MD через каждые 100 пикосекунд (пс) в течение последней 1 нс. Затем каждую из этих различных конформаций передали на MD моделирование, с отсутствием ограничений по остоу белка и при температуре 300K, в течение 2,3 нс. Для каждого из 10 прогонов MD, последние 2000 моментальных снимков, по одному в каждую пс, из траектории MD, затем применяли для подсчета, для каждой аминокислоты A44 мыши, ее среднеквадратичного отклонения (rmsd) в сравнении с положением эталонного медоида. Посредством сравнения усредненного rmsd по 10 отдельным прогонам MD указанной аминокислоты с общим усредненным rmsd всех аминокислот A44, принималось решение, является ли аминокислота достаточно гибкой, как видно во время MD, чтобы рассматриваться, как вероятно, вступающая во взаимодействие с Т-клеточными рецепторами и отвечающая за активацию иммунного ответа. В антителе A44 мыши в качестве гибких идентифицировали 37 аминокислот, при исключении CDR и их непосредственного окружения в пределах 5 Å.

Подвижность 62 наиболее гибких аминокислот A44 мыши, в течение 20 нс (10×2 нс), затем сравнивали с подвижностью соответствующих гибких аминокислот из 49 гомологичных моделей антител зародышевого типа человека, для каждой из которых проводили MD моделирования при 10×2 нс. 49 моделей антител зародышевого типа человека создавали путем систематического комбинирования 7 наиболее распространенных легких цепей антител зародышевой типа человека (vk1, vk2, vk3, vk4, v-лямбда-1, v-лямбда-2, v-лямбда-3) и 7 наиболее обычных тяжелых цепей антител зародышевого типа человека (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). Антитело зародышевого типа человека vk1-vh2 продемонстрировало 4D подобие своих гибких аминокислот со значением 0,58 при сравнении с гибкими аминокислотами антитела A44 мыши; следовательно, антитело зародышевой типа vk1-vh2 применяли для гуманизации антитела A44, при этом внимание сосредоточили на гибких аминокислотах. Антитело зародышевого типа человека v-лямбда-3-vh4 продемонстрировало второе по величине 4D подобие, составляющее 0,57, и также применяли в

качестве основы для гуманизации антитела A44. Для определения взаимосвязей пар аминокислот между аминокислотами A44 мыши и vk1-vh2 2 последовательности выравнивали, исходя из оптимального 3D наложения альфа-углеродных атомов в 2 соответствующих гомологичных моделях. Определение взаимосвязей пар аминокислот между A44 мыши и v-лямбда-3-vh4 осуществляли аналогичным образом. На фигуре 13 показано выравнивание легкой цепи A44 мыши с vk1 и v-лямбда-3. На фигуре 14 показано выравнивание тяжелой цепи A44 мыши с vh2 и vh4.

2) Стабилизация

а) Подход, основанный на знаниях

Аминокислоты легкой и тяжелой цепей с низкой частотой встречаемости в сравнении с их соответственными каноническими последовательностями, за исключением CDR, предложили для мутирования в наиболее часто встречающиеся аминокислоты ($\Delta\Delta G_{th} > 0,5$ ккал/моль; (E. Monsellier, H. Bedouelle. J. Mol. Biol. 362, 2006, p. 580-593)). Первый перечень консенсусных мутаций для LC и HC сократили до аминокислот, встречающихся в самом близком антителе зародышевого типа человека (vk1-vh2). Предполагаемые замены в непосредственной близости от CDR (5 ангстрем, зона "Vernier" (J. Mol. Biol. 224, 1992, p. 487-499)) исключали из рассмотрения. Это дало две стабилизирующие мутации в LC (см. таблицу 15) и пять стабилизирующих мутаций в HC (см. таблицу 16). Другие критерии принимали в расчет для рассмотрения этих мутаций в отношении потенциальной стабилизации антитела A44 к PAI-1. Этими критериями были: благоприятное изменение гидрофобности на поверхности или молекулярная механика на основании предсказанной стабилизации мутанта. Также, о дополнительных стабилизирующих мутациях, которые были успешными, сообщалось в литературе (E. Monsellier & H. Bedouelle, J. Mol. Biol., 362, 2006, p. 580-593; B.J. Steipe et al. J. Mol. Biol., 1994, 240, 188-192), и их рассматривали (см. таблицы 17 и 18), однако, дополнительные мутации не предлагались.

Таблица 15

Стабилизирующие замены, предложенные в легкой цепи

Остаток	Предложенная замена	Рассчитанный $\Delta\Delta G_{th}$	Принятая замена
Lys-3	Val	2,23998	Нет – отсутствует в последовательности зародышевого типа
Met-11	Leu	0,766432	Уже заменена при гуманизации
Tyr-12	Ser	2,04389	Уже заменена при гуманизации
Leu-36	Val	2,17091	Нет – Vernier
Lys-42	Gln	0,939652	Нет – отсутствует в последовательности зародышевого типа
Thr-46	Leu	2,01966	Нет – Vernier
Gln-69	Thr	2,16357	Нет – Vernier
Tyr-80	Ala	2,92454	Уже заменена при гуманизации
Met-83	Leu	2,57007	Уже заменена при гуманизации
Gly-84	Ala	0,597822	Да
Ile-85	Thr	1,27255	Да

Таблица 16

Стабилизирующие замены, предложенные в тяжелой цепи

остаток	Предложенная замена	Рассчитанный $\Delta\Delta G_{th}$	Принятая замена
Glu-1	Gln	0,562423	Да
Met-2	Val	3,41361	Нет – Vernier

Glu-6	Gln	0,655069	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Pro-9	Ala	0,505324	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Ser-10	Glu	2,40018	Уже заменена при гуманизации
Gln-16	Ala	1,11244	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Thr-17	Ser	1,79135	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Leu-18	Val	0,760243	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Ser-19	Lys	1,20539	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Thr-21	Ser	1,3289	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Ser-23	Lys	1,82798	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа

Val-24	Ala	1,35286	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Thr-25	Ser	1,72008	Да
Ile-37	Val	1,66985	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Arg-38	Lys	0,568427	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Lys-39	Gln	2,27769	Да
Phe-40	Arg	1,81199	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Asn-43	Lys	1,42568	Уже заменена при гуманизации
Lys-44	Gly	2,01606	Уже заменена при гуманизации
Tyr-47	Trp	2,62805	Нет - Vernier
Met-48	Ile	1,67766	Нет - Vernier
Pro-61	Glu	1,08569	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Ser-62	Lys	0,840485	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа

Leu-63	Phe	1,25428	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Arg-66	Lys	0,528008	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Ile-67	Ala	1,93707	Нет - Vernier
Ser-68	Thr	1,36475	Да
Ile-69	Leu	0,550185	Нет - Vernier
Arg-71	Val	0,61536	Нет - Vernier
Asn-72	Asp	3,40632	Да
Thr-73	Lys	0,5597	Нет - Vernier
Lys-75	Ser	0,81321	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Asn-76	Ser	0,744463	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Gln-77	Thr	1,30652	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Tyr-78	Ala	2,54699	Нет - Vernier
Val-85	Leu	1,71111	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа
Thr-87	Ser	1,30394	Нет - отсутствует в последовательности зародышевого типа

Thr-90	Ser	0,557686	Нет – отсутствует в последовательности зародышевого типа
Thr-92	Val	1,13795	Нет – отсутствует в последовательности зародышевого типа

Таблица 17

Комбинации оцененных стабилизирующих мутаций

Комбинация*	Предлагаемые дополнительные замены	Принятая замена
L1 (40->P & 42->Q)	Отсутствует – ни одна не заменена	Замены отсутствуют
L2 (45->K)	Отсутствует – уже K45	Отсутствует
L3 (74->T)	Отсутствует – уже T74	Отсутствует
L4 (76->S)	Отсутствует – уже S76	Отсутствует
L5 (84->A, 85->T)	Отсутствует – уже заменена при стабилизации	Отсутствует
H1 (15->G)	Отсутствует – отсутствует в последовательности зародышевого типа	Отсутствует
H2 (61->E, 62->Lys, 63->Phe)	Отсутствует в последовательности зародышевого типа	Отсутствует
H3 (86->T, 87->S, 88->E)	87 и 88 отсутствуют в последовательности зародышевого типа	Отсутствует
S1 (L1 & L5)	Отсутствует	Нет
S2 (H1 & H3)	Отсутствует	Нет

*Примечание Для ссылки на остатки применяли последовательную нумерацию

Оцененные мутации стабилизации

Остаток легкой цепи*	Предлагаемые дополнительные замены	Принятая замена
15->L	V15->L	Отсутствует - V15 в последовательности зародышевого типа Vk1
90->Q	Отсутствует - уже Q90	Отсутствует
32->Y	Отсутствует - уже Y32	Отсутствует
106->I	Отсутствует - уже I106	Отсутствует
63->S	Отсутствует - уже S63	Отсутствует
21->I	Отсутствует - уже M21	Отсутствует

*Примечание Для ссылки на остатки применяли последовательную нумерацию

б) Подходы на основе 3D и MD

О подходах на основе 3D и MD сообщалось ранее (Seco J., Luque F.J., Barril X., J. Med. Chem. 2009 Apr 23;52(8):2363-71; Malin Jonsson et al., J. Phys. Chem. B 2003, 107:5511-5518). Гидрофобные области антитела однозначно идентифицировали, анализируя имитацию молекулярной динамики Fab в бинарном растворителе (20% изопропанола в воде, имитация получения при 20 нс). Проводили дополнительный анализ с применением карты гидрофобной поверхности в рамках программного обеспечения maestro от Schrodinger (v. 8.5.207). Поверхность белка, проанализированная с помощью этих двух способов, является совершенно гидрофильной. Даже при помощи обеих данных методик не установлено присутствие остатков, участвующих в каких-либо гидрофобных участках на поверхностях, следовательно, не предлагалось никаких мутаций, направленных на снижение агрегации.

3) Гуманизация посредством трансплантации

О гуманизации с использованием методик трансплантации сообщалось ранее (P. T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, G. Winter, Nature 1986, 321:522-525). Гуманизацию

начинали путем идентификации двух самых близких последовательностей зародышевого типа человека с переменным доменом легкой и тяжелой цепей антитела A44 к PAI1. Это осуществляли посредством проведения поиска BLAST в сравнении со всеми последовательностями зародышевого типа человека, которые систематично нумеровали (все возможные комбинации V- и J-доменов для каппа- и лямбда-цепей; V-, D- и J-домены для тяжелых цепей). Поиски BLAST осуществляли с использованием интранет-приложения, связанного с сервисом Поиск и анализ информации о последовательности (SIRA), предоставленным Национальным центром биотехнологической информации (NCBI).

Идентифицировали самые близкие последовательности зародышевого типа человека, которые характеризовались 70% и 67% идентичностью последовательности с переменным доменом легкой и тяжелой цепей антитела A44 к PAI1, соответственно. С использованием внутренних последовательностей зародышевого типа из VBASE обнаружили, что легкая цепь была близка с локусом VI-018 (приблизительно 64% идентичность), а тяжелая цепь была близка с локусом 4-30 (приблизительно 69% идентичность) из подсемейства VH4. CDR-области (на основе Kabat) и остатки Vernier обозначены курсивом в случае легкой цепи mA44 (A44LC) и в случае IGVK1-33-01_IGKJ4-01 (IGVK1). Остатки Vernier, как определено в J. Mol. Biol., 1992, 224, 487, подчеркнуты. Мутации гуманизации (выделенные жирным шрифтом) получали посредством осуществления попарного сравнения двух выровненных последовательностей, исключая CDR и остатки из зоны Vernier (также подчеркнуты у мышей), как определено выше. T46L и Q69T из легкой цепи мыши и M2V в тяжелой цепи мыши (остаток из зоны Vernier) подвергали мутированию до преимущественно консервативной последовательности зародышевого типа человек в качестве одной части подхода гуманизации с помощью трансплантации (LC5a, HC5a). В другом варианте эти три остатка из зоны Vernier оставляли, как видно из оригинальной последовательности мыши (LC5b, HC5b).

mA44 – легкая цепь (SEQ ID NO:141)

DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR

ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG
GTKLEIK

IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (SEQ ID NO:107)

DIQMTQSPSS **LSASV**GDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK**AP**KLLIYD
ASNLETGVPS RFSGSGSGTD F**TF**TISSL**Q**P ED**I**ATYYCQQ YDNLPPLTFGG
GTK**V**EIK

mA44 - тяжелая цепь (SEQ ID NO:140)

EMQLQESGPS LVKPSQTL~~SL~~ TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF
PGNKLEYMGY *ITYSGSTYYN* PSLKGRISIT RNTSKNQYYL
QLSSVTTEDT ATYYCARWHY GSPYYFDYWG QGTTTLTVSS
IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 (SEQ ID NO:108)
QVQLQESG**P**G LVKPS**E**TLSL TCT**V**SGGSVS SYYWSWIR**Q**P
PG**K**GLEWIGY IYYSGSTNYN PSLK**S**RV**TIS** VDTSKNQ**F**SL
KLSSVT**A**ADT AVYYCARGYS SSWYYFDYWG QGT**L**VTVSS

Идентифицировали следующие самые близкие последовательности зародышевого типа человека, которые характеризовались 59% и 58% идентичностью последовательности с варибельным доменом легкой и тяжелой цепей антитела A44 к PAI1, соответственно. С использованием внутренних последовательностей зародышевого типа из VBASE обнаружили, что эта легкая цепь была близка с локусом V α III-L6 (~56% идентичность), а тяжелая цепь была близка с локусом 6-01 из подсемейства VH6. CDR-области (на основе Kabat) и области Vernier обозначены курсивом. Области Vernier (как определено в *J. Mol. Biol.*, **1992**, 224, 487) подчеркнуты. Мутации гуманизации получали посредством осуществления попарного сравнения 2 выровненных последовательностей, исключая CDR и остатки из зоны Vernier (также подчеркнуты у мышей), как определено выше, и они выделены жирным шрифтом.

mA44 - легкая цепь (SEQ ID NO:141)

DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG
GTKLEIK

IGKV3-11-02_IGKJ4-01 (SEQ ID NO:143)

EIVLTQSPAT **LSL**SPGERAT **L**SCRASQSVS SYLAWYQQKP G**Q**APRLLIYD
ASNRATG**I**PA RFSGSGSGRD FTLTISSE**P** ED**F**AVYYCQQ RSNWPLTFGG
GTK**V**EIK

mA44 – тяжелая цепь (SEQ ID NO:140)
 EMQLQESGPS LVKPSQTL~~SL~~ TCSVTGDSMT N..GYWNWIR
 KFPGNKLEYM GYIT..YSGS TYYNPSLKGR ISITRNTSKN
 QYYLQLSSVT TEDTATYYCA RWHYGSPYYF DYWGQGTTLT VSS
 IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 (SEQ ID NO:144)
 QVQLQQSGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCAISGDSVS SNSAAWNWIR
 QSPSRGLEWL GRTYYRSKWY NDYAVSVKSR ITINPDTSKN
 QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA RGYSSSWYYF DYWGQGTLVT VSS

4) Мутирование нежелательных мотивов последовательности

Рассматривали следующие мотивы последовательностей: Asp-Pro (кислотная нестабильная связь), Asn-X-Ser/Thr (гликозилирование, X=любая аминокислота, кроме Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (образование сукцинимид/iso-asn в гибких областях), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (поверхностные сайты дезамидирования) и Met (окисление в поверхностных участках). VL- и VH-домены антитела A44 мыши к PAI1 несут два потенциальных сайта гликозилирования: N⁵²RS (в CDR2) в LC и N⁷²TS в HC. Один поверхностный сайт дезамидирования присутствует в CDR1 HC (N³¹G). Три потенциальных сайта образования сукцинимид идентифицировали в оригинальной последовательности мыши: D⁵⁶G (конец CDR2) в LC, и D²⁷S (в CDR1), и D⁸⁹T в HC. Оба проблемные мотивы LC, N⁵²RS и D⁵⁶G, находятся в CDR2. Поскольку эти мутации встречаются в CDR, их подвергали мутированию в двух предложенных сконструированных последовательностях ниже (LC2 и LC4). N⁵² подвергали консервативному мутированию в Gln, а D⁵⁶ подвергали мутированию в Glu. В HC существует четыре проблемных остатка. Первые два встречаются в CDR1: потенциальный сайт образования сукцинимид, D²⁷S, и сайт дезамидирования N³¹G. Два дополнительных проблемных мотива также встречаются в третьей каркасной области. В CDR1, D²⁷ подвергали мутированию в E во избежание образования сукцинимид, в то время как N³¹ изменяли в Q. N⁷² и D⁸⁹ изменяли в Q и E, соответственно. Эти проблемные мотивы подвергали воздействию в сконструированных последовательностях HC2a и HC4, описанных ниже. Вариант HC2b содержит только мутацию сайта дезамидирования N³¹G.

Полученные гуманизированные последовательности подвергали

поиску с помощью blast в отношении сходства последовательностей в сравнении с базой данных IEDB (находится в сети Интернет на сайте immuneepitope.com, версия июнь 2009 г.; Vita R., Zarebeski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The immune epitope database 2.0 *Nucleic Acids Res.* 2010, Jan, 38 (Database issue):D854-62. Epub 2009, Nov 11), что бы убедиться, что ни одна из последовательностей не содержит каких либо известных эпитопов В- или Т-клеток человека (идентичность последовательности, составляющую 70%, применяли в качестве порога для результатов, полученных посредством поиска BLAST и рассматривались только результаты для вида человек). DeClerck, et al. (публикация международной заявки WO 2002034776) раскрыли эпитопы для связывания антитела у PAI-1, ни один из которых не был проблематичным для эпитопов, раскрытых в данном документе.

В случае LC A44 мыши имеется один эпитоп человека из Kirschmann et al. (*The Journal of Immunology*, 1995, 155, 5655-5662). Он обладает ~71% идентичностью на протяжении отрезка из 14 аминокислот, как видно ниже. Заявленная последовательность представляла собой частичную последовательность, которая не была подтверждена с помощью масс-спектрометрии. Никаких данных о связывании не сообщали для этого пептида. Этот эпитоп был представлен во всех предложенных вариантах LC. Никаких потенциальных проблематичных эпитопов не идентифицировали, если подобный поиск проводили для HC.

5) Оригинальные последовательности из переменных доменов антитела к PAI1

CDR обозначены жирным шрифтом, а области Vernier (как определено по Foote & Winter, *J. Mol. Biol.*, 1992, 224:487-499) подчеркнуты.

Легкая цепь (SEQ ID NO:142)

1 DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN **SYLSWLQQKP** GKSPKTLIYR
51 **ANRSVDGVPS** RFSGSGSGQD YSLTISLEY EDMGIYYCLQ **YDEFPTFGG**
101 GTKLEIKRAD APTVSIF

Показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа=70% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VI-018]

Тяжелая цепь (SEQ ID NO:140)

1 EMQLQESGPS LVKPSQTL^{SL} TCSVT**GDSMT** **NGYWN**WIRKF PGNKLEY**MGY**
 51 **ITYSGSTYYN** PSLKGRISIT ^{RNT}SKNQYYL QLSSVTTEDT ATYYCAR**WHY**
 101 **GSPYYFDY**WG QGTTLTVSS

Показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа=67% с IGHV4-59-02_IGHD6-137-01_IGHJ4-02 [VH4 4-30]

6) Сконструированные последовательности

Подходы 4D гуманизации и трансплантации применяли к двум самым близким последовательностями зародышевого типа человека

а) Сконструированные последовательности легкой цепи

LC1a содержит семь мутаций, полученных на основании способа 4D гуманизация с использованием самой близкой последовательности зародышевого типа, vk1. LC1b имеет 12 мутаций, полученных на основании 4D гуманизации со второй самой близкой последовательностью зародышевого типа человека, vl3. LC2 содержит 2 дополнительных мутаций в CDR2 по сравнению с LC1a. Эти мутации направлены на потенциальный сайт гликозилирования (N⁵²RS) и потенциальный сайт образование сукцинимиды (D⁵⁶G). LC3 содержит мутации на основании 4D гуманизации с самой близкой последовательностью зародышевого типа с дополнительными 2 стабилизирующими мутациями. LC4 комбинирует мутации гуманизации, стабилизации и мутирования нежелательных мотивов. CDR и зоны vernier обозначены курсивом, остатки vernier подчеркнуты, мутации гуманизации выделены жирным шрифтом, проблемные мотивы показаны двойным зачеркиванием, а стабилизирующие мутации показаны с помощью букв нижнего регистра. На фигурах 16 и 17 показана сводная информация по мутациям.

LC1a (SEQ ID NO:91):

1 DIKMTQSPSS **LSASV**GDRVT ITCKASQDIN SYLSW**L**QQKP GKSPK**T**LIYR
 51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISS**LQ**P ED**L**GIYYCLQ YDEF**PPT**FGG
 101 GTKLEIK

Никаких дополнительных эпитопов человека для последовательности LC1a не обнаружено в базе данных IEDB. Показатель идентичности LC1a с последовательностью зародышевого типа=76% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VKI-018].

LC1b (SEQ ID NO:92):

1 DIKMTQSPSS **VSVSPGQ**TVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GQSPKTLIYR
 51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSL**QA** MDEGIYYCLQ YDEFPPTFGG
 101 GTKL**T**IK

В дополнение к эпитопу, описанному в разделе 4 выше, K39PGQSPKTLI имеет 70% идентичность последовательности с KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Сообщается, что этот пептид характеризуется IC₅₀>100000 нМ в отношении всех аллелей HLA-DR, с которыми проводили его тестирование. Показатель идентичности LC1b с последовательностью зародышевого типа=67% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VkI-018].

LC2 (SEQ ID NO:93):

1 DIKMTQSPSS **LSASVG**DRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
 51 AQRVSEGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSL**QP** EDLGIYYCLQ YDEFPPTFGG
 101 GTKLEIK

Никаких дополнительных эпитопов человека для последовательности LC2 не обнаружено в базе данных IEDB.

Показатель идентичности LC2 с последовательностью зародышевого типа=76% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VkI-018].

LC3 (SEQ ID NO:94):

1 DIKMTQSPSS **LSASVG**DRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
 51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSL**QP** EDLatYYCLQ YDEFPPTFGG
 101 GTKLEIK

Никаких дополнительных эпитопов человека для последовательности LC3 не обнаружено в базе данных IEDB. Показатель идентичности LC3 с последовательностью зародышевого типа=78% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VkI-018].

LC4 (SEQ ID NO:95):

1 DIKMTQSPSS **LSASVG**DRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
 51 AQRVSEGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSL**QP** EDLatYYCLQ YDEFPPTFGG
 101 GTKLEIK

Никаких дополнительных эпитопов человека для последовательности LC4 не обнаружено в базе данных IEDB. Показатель идентичности LC4 с последовательностью зародышевого типа=78% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VkI-018].

LC5a (SEQ ID NO:96):

```
1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKLLIYR
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGTD YTFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTFGG
101 GTKVEIK
```

В дополнение к эпитопу, описанному в разделе 4 выше, A43PKLLIYRAN имеет 80% идентичность последовательности с APKLLIYAASSL (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Для этого пептида не определяли молекулярную массу и никаких данных о связывании не сообщалось. Показатель идентичности LC5a с последовательностью зародышевого типа=85% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-018].

LC5b (SEQ ID NO:97):

```
1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKTLIYR
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YTFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTFGG
101 GTKVEIK
```

Никаких дополнительных эпитопов человека для последовательности LC5b не идентифицировали в базе данных IEDB.

Показатель идентичности LC5b с последовательностью зародышевого типа=83% с IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-018].

LC5c (SEQ ID NO:98):

```
1 EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQDIN SYLSWLQQKP GQAPRTLIYR
51 ANRSVDGIPA RFSGSGSGQD YTLTISSLEP EDFAVYYCLQ YDEFPPTFGG
101 GTKVEIK
```

В дополнение к эпитопу, описанному в разделе 4 выше, K³⁹PGQAPRTLII имеет 80% идентичность последовательности с KPGQPRLII (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Сообщается, что этот пептид характеризуется IC₅₀>100000 нМ в отношении всех аллелей HLA-DR, с которыми проводили его тестирование. Показатель идентичности LC5c с последовательностью зародышевого типа=79% с IGKV3-11-02_IGKJ4-01 [VκIII-L6]. Схематическое изображение всех мутаций в легкой цепи показано на фигуре 15.

б) Сконструированные последовательности тяжелой цепи

HC1a содержит восемь мутаций, полученных на основании способа 4D гуманизации с самой близкой последовательностью

зародышевого типа человека. HC1b содержит шесть мутаций, полученных на основании способа 4D гуманизации со 2^{ой} самой близкой последовательностью зародышевого типа. HC2a содержит четыре дополнительные мутации при сравнении с HC1a, которые направлены на нежелательные мотивы последовательности. В HC2b подвергается изменению только сайт дезамидирования в CDR1 (N³¹G). HC3 содержит мутации гуманизации из HC1a с дополнительными пятью стабилизирующими мутациями. HC4 содержит мутации гуманизации из HC1a, стабилизирующие мутации из HC3 и мутации, направленные на проблемные мотивы из HC2a. CDR и зоны vernier обозначены курсивом, остатки vernier подчеркнуты, мутации гуманизации выделены жирным шрифтом, проблемные мотивы показаны двойным зачеркиванием, а стабилизирующие мутации показаны с помощью букв нижнего регистра.

HC1a (SEQ ID NO:82):

```
1 EMTLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKALEYMGY
51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL TLSSVTTVDT ATYYCARWHY
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS
```

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC1a в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC1a с последовательностью зародышевого типа=68% с IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC1b (SEQ ID NO:83):

```
1 EMQLQESGPG LVKPSETLSL TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKGLEYMGY
51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL KLSSVTTADT ATYYCARWHY
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS
```

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC1b в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC1b с последовательностью зародышевого типа=73% с IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC2a (SEQ ID NO:84):

```
1 EMTLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVTGESMT QGYWNWIRKF PGKALEYMGY
51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RQTSKNQYYL TLSSVTTVET ATYYCARWHY
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS
```

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC2a в базе данных IEDB. Показатель

идентичности HC2a с последовательностью зародышевого типа=67% с IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC2b (SEQ ID NO:85):

1 E**MTL**KESGPT LVKP**T**QTL~~SL~~ TCSVTGDSMT QGYWNWIRKF PG**K**ALEYMGY
 51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL **TL**SSVT**T**VDT ATYYCARWHY
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC2b в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC2b с последовательностью зародышевого типа=67% с IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC3 (SEQ ID NO:86):

1 qE**MTL**KESGPT LVKP**T**QTL~~SL~~ TCSVsGDSMT NGYWNWIRqF PG**K**ALEYMGY
 51 ITYSGSTYYN PSLKGRItIT RdTSKNQYYL **TL**SSVT**T**VDT ATYYCARWHY
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC3 в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC3 с последовательностью зародышевого типа=72% с IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC4 (SEQ ID NO:87):

1 qE**MTL**KESGPT LVKP**T**QTL~~SL~~ TCSVsGESMT QGYWNWIRqF PG**K**ALEYMGY
 51 ITYSGSTYYN PSLKGRItIT RQTSKNQYYL **TL**SSVT**T**VET ATYYCARWHY
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC4 в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC4 с последовательностью зародышевого типа=70% с IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC5a (SEQ ID NO:88):

1 QVQLQESGPG LVKP**S**ETL~~SL~~ TC**T**V**S**GDSMT NGYWNWIR**Q**P PG**K**GLEYMGY
 51 ITYSGSTYYN PSLK**S**R**I**T**I**S RNTSKNQYSL **KL**SSVT**A**ADT AVYYCARWHY
 101 GSPYYFDYWG QGT**L**VTSS

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC5a в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC5a с последовательностью зародышевого типа=84% с IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5b (SEQ ID NO:89):

1 QMQLQESGPG LVKP**S**ETL~~SL~~ TC**T**V**S**GDSMT NGYWNWIR**Q**P PG**K**GLEYMGY

51 *ITYSGSTYYN PSLKSR***ITIS** **RD****TSKNQYSL** **KLSSVT****AADT** **AVYYCAR****WHY**
 101 *GSPYYFDYWG QGTL**LVT****VSS***

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC5b в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC5b с последовательностью зародышевого типа=84% с IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5c (SEQ ID NO:90):

1 **QMQLQ****QSGPG** LVKPSQTL~~SL~~ TCAIS**GDSMT** NGYWNWIR**QS** **PSR****GLE****YMGY**
 51 *ITYSGSTYYA* **VSVKSR****ITIN** **RD****TSKNQYSL** **QLSSVT****PEDT** **AVYYCAR****WHY**
 101 *GSPYYFDYWG QGTL**LVT****VSS***

Никаких эпитопов человека не идентифицировали для последовательности HC5c в базе данных IEDB. Показатель идентичности HC5c с последовательностью зародышевого типа=78% с IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH6 6-01].

Схематическое изображение всех мутаций в тяжелой цепи показано на фигуре 16.

с) Комбинации вариантных последовательностей тяжелой и легкой цепей

Для трансплантации создавали три версии легкой цепи (LC5a, LC5b, LC5c) и три версии тяжелой цепи (HC5a, HC5b, HC5c). LC5a содержит 16 мутаций, полученных на основании трансплантации в самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет CDR мыши и большинство остатков из зоны Vernier мыши. Два остатка Vernier мыши, T46 и N69, не присутствуют в какой-либо последовательности зародышевого типа человека, и их подвергали консервативному мутированию. LC5b содержит 14 мутаций, полученных на основании трансплантации в самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет CDR мыши и все остатки из зоны Vernier мыши. LC5c содержит 22 мутации, полученные на основании трансплантации во вторую самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет CDR мыши и все остатки из зоны Vernier мыши.

HC5a содержит 20 мутаций, полученных на основании трансплантации в самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет CDR мыши и большинство остатков из зоны Vernier мыши за исключением M2V. Met встречается с очень

низкой вероятностью в этом положении в последовательностях зародышевого типа человека. HC5b содержит 20 мутаций, полученных на основании трансплантации в самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет CDR мыши и все остатки из зоны Vernier мыши. HC5c содержит 23 мутации, полученные на основании трансплантации во вторую самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет CDR мыши и все остатки из зоны Vernier мыши.

Всего получали десять комбинаций (обобщены в таблице 19):

LC1a×HC1a (мутации, связанные с 4D гуманизацией на основании самой близкой последовательности зародышевого типа)

LC1b×HC1b (мутации, связанные с 4D гуманизацией на основании 2^{ой} самой близкой последовательности зародышевого типа)

LC2×HC2a (мутации, связанные с 4D гуманизацией и мутированием нежелательных последовательностей)

LC2×HC2b (мутации, связанные с 4D гуманизацией и мутированием нежелательных последовательностей)

LC1a×HC2b (мутации, связанные с 4D гуманизацией и мутированием нежелательных последовательностей)

LC3×HC3 (мутации, связанные с 4D гуманизацией и стабилизацией)

LC4×HC4 (мутации, связанные с 4D гуманизацией, мутированием нежелательных последовательностей и стабилизацией)

LC5a×HC5a (мутации, связанные с гуманизацией путем трансплантации с сохранением CDR и внедрением 3 консервативных модификаций Vernier)

LC5b×HC5b (мутаций, связанные с гуманизацией путем трансплантации с сохранением областей CDR и Vernier)

LC5c×HC5c (мутаций, связанные с гуманизацией путем трансплантации с сохранением областей CDR и Vernier)

Таблица 19

Сводная информация по десяти комбинациям LC×HC

	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H+UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H+UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
HC1a (H)	X (1)							
HC1b (H)		X (2)						
HC2a (H+UM)			X (3) Low					
HC2b (H+UM)	X (4)		X (5)					
HC3 (H+S)			X (11)	X (6)	X (12)			
HC4 (H+UM+S)					X (7) Low			
HC5a (G)						X (8)		
HC5b (G)			X (13)		X (14)		X (9)	
HC5c (G)								X (10) Низкий

H=гуманизация; UM= нежелательные мотивы; S=стабилизация;
G=трансплантация

Низкий=низкие уровни экспрессии

Число в () указывает на номер варианта; примечание:
варианты 11-14 добавили после определения характеристик десяти
оригинальных вариантов (варианты 1-10)

Таблица 21

Мутации в восьми вариантах LC из антитела A44 к PAI1

Нумерация в последовательности LC	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H- UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H- UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
Asp1								Glu
Lys3						Gln	Gln	Val
Ser9								Ala
Ser10								Thr
Met11	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
Tyr12	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Ala13		Val						Leu
Leu15	Val	Pro	Val	Val	Val	Val	Val	Pro
Glu17	Asp	Gln	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	
Arg18		Thr						
Val19								Ala
Ile21								Leu
Thr22								Ser
Lys42		Gln						Gln
Ser43						Ala	Ala	Ala
Lys45								Arg
Thr46						Leu		
Asn52			Gln		Gln			
Asp56			Glu		Glu			
Val58								Ile
Ser60								Ala
Gln69						Thr		
Ser72						Thr	Thr	Thr
Leu73						Phe	Phe	
Glu79	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	
Tyr80	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Glu81		Met						
Met83	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe

Gly84				Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Ile85				Thr	Thr	Thr	Thr	Val
Leu104						Val	Val	Val
Glu105		Thr						
Число мутаций	7	12	9	9	11	16	14	22

H=гуманизация; UM= нежелательные мотивы; S=стабилизация;
G=трансплантация

Таблица 22

Мутации в девяти вариантах HC из антитела A44 к PAI1

Нумерация в последовательности HC	HC1a (H)	HC1b (H)	HC2a (H-UM)	HC2b (H-UM)	HC3 (H+S)	HC4 (H-UM+S)	HC5a (G)	HC5b (G)	HC5c (G)
Glu1					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Met2							Val		
Gln3	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Glu5	Lys		Lys	Lys	Lys	Lys			Gln
Ser10	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly
Ser15	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Gln16		Glu					Glu	Glu	
Ser23							Thr	Thr	Ala
Val24									Ile
Thr25					Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Asp27			Glu			Glu			
Asn31			Gln	Gln		Gln			
Lys39					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Phe40							Pro	Pro	Ser
Gly42									Ser
Asn43	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg
Lys44	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly
Asn60									Ala
Pro61									Val
Leu63									Val
Gly65							Ser	Ser	Ser

Ser68					Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
Thr70							Ser	Ser	Asn
Asn72			Gln		Asp	Gln		Asp	Asp
Tyr79							Ser	Ser	Ser
Gln81	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Lys	
Thr87							Ala	Ala	Pro
Glu88	Val	Ala	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	
Asp89			Glu			Glu			
Thr92							Val	Val	Val
Thr114							Leu	Leu	Leu
Leu115							Val	Val	Val
число мутаций	8	6	12	9	13	16	20	20	23

N=гуманизация; UM= нежелательные мотивы; S=стабилизация;
G=трансплантация

Суммарно, во время способа гуманизации получили десять вариантов. Эти варианты экспрессировали и определяли их характеристики в нескольких *in vitro* анализах, как описано ниже.

7) Определение характеристик вариантов гуманизации

На основании *in silico* моделирования, представленного в вышеприведенном примере, получали десять вариантов (варианты 1-8 с помощью 4D гуманизации и варианты 9-10 с помощью трансплантации CDR; варианты 3 и 10 создавали на основании второй самой близкой последовательности зародышевого типа). Вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи ДНК гуманизированного A44 получали для экспрессии в HEK293. Белки получали после клонирования соответствующей ДНК в плазмиды pXL (New England Biolabs; NheI/Eco47III для HC, NheI/BsiWI для LC). Гуманизированные последовательности подвергали процедуре оптимизации кодонов для экспрессии в HEK и ген синтезировали с помощью GeneArt (дочерняя компания Life Technologies). Полученные плазмиды совместно трансфицировали и подвергали временной экспрессии в системе экспрессии FreeStyle™293 (Invitrogen, кат. № K9000-01). Варианты 3 и 10 экспрессировались

очень слабо и далее не исследовались. Все остальные варианты экспрессировали и очищали с использованием колонки с белком А. С помощью аналитических гелей было показано частичное гликозилирование (приблизительно 5-10%) легких цепей в вариантах 6 и 9 и тяжелых цепей в вариантах 5 и 7 (данные не показаны). Оставшиеся восемь вариантов тестировали с помощью хромогенного анализа с использованием hPAI и в анализе образования плазмينا на звездчатых клетках человека с использованием гликозилированного PAI человека. Результаты показаны в таблице 23.

Таблица 23

Определение характеристик вариантов гуманизации в анализе образования плазмينا и хромогенном анализе

mAb	Активация плазминогена		Хромогенный анализ
	IC50 (нМ)	Y50%	IC50 (нМ)
A44	3,17	45,99	0,44
A44-hv1	3,12	44,99	0,49
A44-hv2	Не определено	Не определено	0,60
A44-hv4	Неактивный	26,00	0,52
A44-hv5	Не определено	Не определено	1,11
A44-hv6	1,78	56,94	0,82
A44-hv7	Не определено	Не определено	0,59
A44-hv8	Неактивный	11,00	0,76
A44-hv9	1,9	46,53	0,86

Варианты 6 и 9 демонстрировали наилучшую эффективность в анализе образования плазмينا, но характеризовались частичным (5-10%) гликозилированием у легкой цепи. Исходя из этих результатов, получили новые варианты 11-14 с использованием комбинации тяжелых цепей из вариантов 6 и 9 и легких цепей из вариантов 5 и 7. В таблице 24 обобщены все созданные варианты.

Таблица 24

Варианты гуманизации

№ варианта	Описание	SEQ ID NO
A44-hv1	LC1a×HC1a	109
A44-hv2	LC1b× HC1b	110
A44-hv3	LC2×HC2a	111
A44-hv4	LC1a×HC2b	112
A44-hv5	LC2×HC2b	113
A44-hv6	LC3×HC3	114
A44-hv7	LC4×HC4	115
A44-hv8	LC5a×HC5a	116
A44-hv9	LC5b×HC5b	117
A44-hv10	LC5c×HC5c	118
A44-hv11	LC2×HC3	119
A44-hv12	LC4×HC3	120
A44-hv13	LC2×HC5b	121
A44-hv14	LC4×HC5b	122

Таблица 25

ДНК последовательность вариантов гуманизации

	Ген	Белок
HC1a	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO:123)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSTLCS VTGDSMTNGYWNWIRKFPKALE YMGYITYSGSTYYNPSLKGRISI TRNTSKNQYYLTLSSVTTVDTAT YYCARWHYGGSPYYFDYWQGTTL TVSS (SEQ ID NO:82)

HC1b	GAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGAAGCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO:124)	EMQLQESGPGLVKPSETLSLTCS VTGDSMTNGYWNWIRKFPKGLE YMGYITYSGSTYYNPSLKGRISI TRNTSKNQYYLKLSSVTTADTAT YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTL TVSS (SEQ ID NO:83)
HC2a	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO:125)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSTCS VTGESMTQGYWNWIRKFPKALE YMGYITYSGSTYYNPSLKGRISI TRQTSKNQYYLTLSSVTTVETAT YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTL TVSS (SEQ ID NO:84)
HC2b	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGACAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO:126)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSTCS VTGDSMTQGYWNWIRKFPKALE YMGYITYSGSTYYNPSLKGRISI TRNTSKNQYYLTLSSVTTVDTAT YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTL TVSS (SEQ ID NO:85)

HC3	CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCACC ATCACCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO:127)	QMTLKESGPTLVKPTQTLSTCS VSGDSMTNGYWNWIRQFPGKALE YMGYITYSGSTYYNPSLKGRTI TRDTSKNQYYLTLSSVTTVDTAT YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTL TVSS (SEQ ID NO:86)
HC4	CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGTCCGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCACC ATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO:128)	QMTLKESGPTLVKPTQTLSTCS VSGESMTQGYWNWIRQFPGKALE YMGYITYSGSTYYNPSLKGRTI TRQTSKNQYYLTLSSVTTVETAT YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTL TVSS (SEQ ID NO:87)
HC5a	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCAC CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCAGCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACAGCC TGAAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO:129)	QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCT VSGDSMTNGYWNWIRQPPGKGLE YMGYITYSGSTYYNPSLKSRTI SRNTSKNQYSLKLSSVTAADTAV YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:88)

HC5b	CAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCAC CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACAGCC TGAAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO:130)	QMQLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGDSMTNGYWNWIRQPPGKGLE YMGYITYSGSTYYNPSLKSRTI SRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAV YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:89)
HC5c	CAGATGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGC CATCAGCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGAGCCCCAGCAGAGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGGATCACC ATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACAGCC TGCAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO:131)	QMQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCA ISGDSMTNGYWNWIRQSPSRGLE YMGYITYSGSTYYAVSVKSRITI NRDTSKNQYSLQLSSVTPEDTAV YYCARWHYGSPYYFDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:90)
LC1a	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACGG CGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGGC CAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGC CCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO:132)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVITIC KASQDINSYLSWLQQKPGKSPKT LIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQ DYSLTISLQPEDLGIYYCLQYD EFPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:91)

LC1b	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCGTGT CCGTGTCTCCTGGCCAGACCGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACGG CGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGGC CAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGG CCATGGACGAGGGCATC (SEQ ID NO:133)	DIKMTQSPSSSVSPGQTVTITC KASQDINSYLSWLQQKPGQSPKT LIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQ DYSLTISLQAMDEGIYYCLQYD EFPPTFGGGTKLTIK (SEQ ID NO:92)
LC2	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGCGTGGAAGG CGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC CAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGC CCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO:134)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVITIC KASQDINSYLSWLQQKPGKSPKT LIYRAQRSVEGVPSRFSGSGSGQ DYSLTISLQPEDLGIYYCLQYD EFPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:93)
LC3	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACGG CGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGGC CAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGC CCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO:135)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVITIC KASQDINSYLSWLQQKPGKSPKT LIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQ DYSLTISLQPEDLATYYCLQYD EFPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:94)

LC4	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGCGTGGAAGG CGTGCCAAGCAGATTTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC CAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGC CCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO:136)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITC KASQDINSYLSWLQQKPGKSPKT LIYRAQRSVEGVPSRFSGSGSGQ DYSLTISLQPEDLATYYCLQYD EFPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:95)
LC5a	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGC TGCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGACGG CGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGC CCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO:137)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC KASQDINSYLSWLQQKPGKAPKL LIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGT DYTFTISLQPEDLATYYCLQYD EFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:96)
LC5b	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGACGG CGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGGC CAGGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGC CCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO:138)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC KASQDINSYLSWLQQKPGKAPKT LIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQ DYTFTISLQPEDLATYYCLQYD EFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:97)

LC5c	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGT CTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCCGCCAGGCCCCCAGAA CCCTGATCTACCGGGCCAACAGAAGCGTGGACGG CATCCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC CAGGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAAC CCGAGGACTTCGCCGTG (SEQ ID NO:139)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC KASQDINSYLSWLQQKPGQAPRT LIYRANRSVDGIPARFSGSGSGQ DYTLTISSLEPEDFAVYYCLQYD EFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)
Белок		
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF (SEQ ID NO:99)	
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:100)	

Все варианты, за исключением вариантов 3 и 10 со слабой экспрессией, тестировали с помощью Biacore в отношении PAI-1 человека и макака-крабоеда и комплекса витронектин-PAI-1. Данные представлены в таблице 26.

Таблица 26

Определение характеристик вариантов гуманизации с помощью
Biacore

Витронектин на чипе/PAI-1 человека			
mAb/hPAI-1/Vn	ka1 (1/Mc)	kd 1 (1/c)	KD (M)
Исходное A44*	5,68E+06	2,29E-04	4,04E-11
A44-hv1*	1,10E+07	5,55E-04	5,26E-11
A44-hv2**	2,99E+06	4,03E-04	1,35E-10
A44-hv4*	4,59E+06	8,80E-05	1,92E-11
A44-hv5*	2,72E+06	2,76E-05	1,02E-11
A44-hv6*	4,38E+06	5,68E-05	1,33E-11
A44-hv7**	4,14E+06	3,94E-04	9,64E-11

A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6,36E+06	1,03E-04	1,70E-11
A44-hv11*	7,66E+06	1,22E-04	1,56E-11
A44-hv12*	5,15E+06	8,14E-05	1,61E-11
A44-hv13**	2,40E+06	4,36E-04	1,79E-10
A44-hv14*	4,06E+06	3,95E-05	9,57E-12
Витронектин на чипе/PAI-1 макака-крабоведа			
mAb/cPAI-1/Vn	ka1 (1/Мс)	kd 1 (1/с)	KD (М)
Исходное A44*	3,98E+06	2,75E-04	6,96E-11
A44-hv1**	3,37E+06	8,27E-03	2,45E-09
A44-hv2**	2,30E+06	3,14E-04	1,37E-10
A44-hv4**	2,26E+05	1,70E-04	7,52E-10
A44-hv5*	3,40E+06	1,11E-04	3,26E-11
A44-hv6*	5,26E+06	2,51E-05	5,01E-12
A44-hv7**	2,50E+06	2,39E-04	9,56E-11
A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6,51E+06	1,34E-04	2,15E-11
A44-hv11**	1,56E+06	6,00E-04	3,87E-10
A44-hv12*	4,26E+06	2,35E-04	5,69E-11
A44-hv13**	2,12E+06	2,43E-04	1,15E-10
A44-hv14*	5,86E+06	2,13E-04	3,86E-11
Антитело к Fc IgG человека на чипе/PAI-1 человека			
mAb/hPAI-1*	ka1 (1/Мс)	kd 1 (1/с)	KD (М)
A44-hv11/hPAI-1	1,57E+06	6,68E-05	4,25E-11
A44-hv12/hPAI-1	1,62E+06	6,70E-05	4,14E-11
A44-hv13/hPAI-1	1,54E+06	2,52E-05	1,64E-11
A44-hv14/hPAI-1	1,25E+06	3,42E-05	2,70E-11
Антитело к Fc IgG человека на чипе/PAI-1 макака-крабоведа			
mAb/cPAI-1*	ka1 (1/Мс)	kd 1 (1/с)	KD (М)
A44-hv11/hPAI-1	1,87E+06	5,60E-05	3,00E-11
A44-hv12/hPAI-1	2,24E+06	5,45E-05	2,44E-11

A44-hv13/hPAI-1	1,89E+06	5,08E-05	2,70E-11
A44-hv14/hPAI-1	2,32E+06	2,69E-05	1,15E-11

n/a означает, что вариант не связывался эффективно с комплексом витронектин/PAI-1

*Модель молекулярного взаимодействия 1:1

**Модель реакция с участием двух состояний (изменение конформации)

Данные по Biacore не выявили значительных отличий между гуманизированными вариантами. Все гуманизированные варианты, за исключением варианта 8, демонстрировали сродство к обоим PAI-1 макака-крабоеда и PAI-1 человека, а также PAI-1 в комплексе с витронектином в пределах диапазона допустимых значений. При сравнении с исходным A44 оказалось, что гуманизация не меняет сродство антитела.

Хотя сродство и эффективность гуманизированных вариантов не отличались значительно в хромогенном анализе и анализе с помощью Biacore, способность вариантов к восстановлению образования плазмينا в клеточных анализах была значительно ниже, чем у исходного антитела мыши для нескольких вариантов (см. таблицу 27, обобщающую сравнение хромогенного анализа и клеточных анализов ниже). Гуманизированные варианты 11-14 тестировали в отношении способности блокировать PAI-1 в клеточном анализе.

Таблица 27

Определение характеристик вариантов гуманизации 11-14 в образовании плазмينا

mAb	Активация плазминогена		
	IC50 (нМ)	Y50%	n
A44	3,13	79,79	6
A44-hv11	2,01	85,82	6
A44-hv12	1,99	76,70	6
A44-hv13	1,82	71,10	6
A44-hv14	1,82	61,22	6
A44-hv9	1,51	50,92	4
A44-hv1	2,08	58,50	2

Варианты 11-14 демонстрировали хорошую эффективность в

анализе образования плазмина и их характеристики дополнительно определяли в дополнительных *in vitro* анализах.

8) Определение характеристик вариантов гуманизации в печени человека

Дополнительный скрининг гуманизированных вариантов 11-14 осуществляли с использованием полученного эндогенным путем PAI-1 человек из плазмы крови человека и образцов фиброзных участков печени человека.

Активность PAI-1 оценивали путем измерения способности этого белка *serpin* образовывать стабильный комплекс с урокиназой, иммобилизованной на 96-луночных планшетах. После отмывки несвязанного PAI-1 комплексы uPA-PAI-1 обнаруживали с помощью применения поликлональных антител к PAI-1. Затем связанные поликлональные антитела к PAI-1 (количество которых пропорционально содержанию активного PAI-1 в образце) обнаруживали с использованием вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (Molecular Innovation кат. № HPAIKT). Различные концентрации гуманизированных вариантов A44 инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре с одним из рекомбинантных PAI-1 человека или макака-крабоеда (конечная концентрация 0,31 нМ) и затем тестировали в отношении функционально активного PAI-1 по комплексу uPA-PAI-1 с использованием ELISA, описанного выше. Образцы сравнивали со стандартом PAI-1 человека. Плазму крови человека от пациентов с высоким BMI с высокими уровнями активного PAI-1 разводили в 4 раза и инкубировали с возрастающими количествами гуманизированных вариантов A44. Уровни оставшегося активного PAI-1 определяли с использованием обнаружения комплекса uPA-PAI-1 с помощью ELISA. Нейтрализацию рекомбинантного PAI-1 макака-крабоеда также тестировали с помощью образования плазмина для подтверждения перекрестной реактивности.

Способность гуманизированных вариантов блокировать активность
эндогенного PAI-1

Стандарт hPAI-1			TH1782 плазма крови человека				PAI-1 макака-крабоеда		
IC50 (нМ)	Y50%	n	mAb	IC50 (нМ)	Y50%	N	IC50 (нМ)	Y50%	n
1,31E-01	50,80	2	A44-hv11	1,57E-02	37,50	2	4,24E-02	50,80	2
1,14E-01	53,45	2	A44-hv12	3,35E-03	37,68	2	2,66E-02	53,45	2
1,66E-01	52,82	2	A44-hv13	3,11E-02	61,35	2	2,81E-02	52,82	2
5,63E-02	52,47	2	A44-hv14	5,86E-02	73,90	2	2,87E-02	52,47	2

Образцы фиброзных участков печени человека (предоставлены Biopredic International, Ренн, Франция, результат хирургического удаления печеночных метастазов рака толстой кишки) гомогенизировали следующим образом: взвешенные замороженные образцы печени гомогенизировали в сухих пробирках, содержащих керамические гранулы (кат № 03961-1-003, Bertin Technology, Франция) с использованием гомогенизатора Precellys (Bertin Technology, Франция; 4°C, 2×30 секунд при 6800 об./мин.) и затем растворяли с использованием 1 мл/г буфера для лизиса (1,5M NaCl в TBS – раствор Tris буфера 0,1M Tris+0,15M NaCl, pH7,4). После центрифугирования при 4°C при 5000g в течение 10 минут лизат печени в надосадочной жидкости собирали и хранили замороженным при -80°C. Определение общей концентрации белка с использованием стандартного анализа BCA и уровней активного и общего PAI-1 (определяли с помощью ELISA по комплексу UK-PAI, предоставлен Mol Innov, кат. № HPAIKT и кат. № MPAIKT-TOT) осуществляли согласно инструкциям производителя с помощью нанесения на график концентрации стандарта PAI-1 человека и A450 нм с использованием программного обеспечения Biostat Calibration. Возрастающие концентрации гуманизированных вариантов A44 инкубировали с лизатом печени, разбавленным до 2,5 нМ активного PAI-1, оценивали, как описано выше, и данные анализировали. Ингибирование активности PAI-1 (активность PAI-1 без mAb представляет собой 0% ингибирования, в случае IgG1 не происходило значительное и зависящее от дозы ингибирование PAI-

1) рассчитывали для каждой концентрации mAb. Процентное значение ингибирования активности PAI-1 активность наносили график в зависимости от концентрации mAb и IC50 определяли I_{max} с использованием программного обеспечения Biostat speed. Данные показаны на фигуре 17 и в таблице 29.

Таблица 29

Нейтрализация активности PAI-1 с помощью A44-hv11 в печени человека

	IC50 (нМ)	I _{max} (%)
A44-hv11 (1 нМ)	0,0365	99,997
A44-hv11 (2 нМ)	0,0503	99,99
A44-hv11 (3 нМ)	0,0465	99,99
Среднее значение +/- sem	0,0444 +/- 0,004	99,99

Исходя из вышеизложенных данных, A44-hv11 отбирали для дополнительного определения характеристик в дополнительных структурных исследованиях и дополнительных *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

Пример 13: Гуманизация антитела APG с помощью трансплантации

О гуманизации с использованием методики трансплантации сообщалось ранее (P. T. Jones, et al., Nature 1986, 321:522-525). Гуманизация антитела APG мыши к PAI1 начинали с легкой цепи мыши (SEQ ID NO:148) и тяжелой цепи мыши (SEQ ID NO:149) из заявки на патент Германии № DE2000153251; это антитело мыши также описано в Debrock et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337(2):257-266 (1997). При идентификации последовательностей зародышевого типа и канонических классов HC- и LC-цепи антитела мыши получили muIGHV1-39 и muIGKV14-111, соответственно. Затем идентифицировали перечень последовательностей зародышевого типа человека, близких с варибельным доменом легкой и тяжелой цепей антитела APG к PAI1, и ранжировали его согласно процентному значению идентичности. Обе стадии осуществляли посредством проведения поиска BLAST в сравнении со всеми последовательностями зародышевого типа человека, которые

систематично нумеровали (все возможные комбинации V- и J-доменов для каппа- и лямбда-цепей; V-, D- и J-домены для тяжелых цепей). Поиски BLAST осуществляли с использованием инструмента IMGT/DomainGapAlign, представленного на сайте <http://www.imgt.org>. (См. Ehrenmann, et al. *Cold Spring Harbor Protocols* 2011.6 (2011)). Идентифицировали самые близкие последовательности зародышевого типа человека, которые характеризовались 67,4% и 63,3% идентичностью последовательности с переменным доменом легкой и тяжелой цепей антитела APG к PAI1, соответственно. С использованием базы данных IMGT обнаружили, что легкая цепь близка с HuIGKV1-33, а тяжелая цепь была близка с HuIGHV1-46. Обнаружили, что самая близкая последовательность зародышевого типа человека с переменным доменом тяжелой цепи APG к PAI-1 с совпадающим каноническим классом, представляла собой HuIGHV7-4-1 с идентичностью последовательности, составляющей 62,2%.

CDR-области (на основе комбинации Kabat и IMGT в случае APG) и остатки Vernier обозначены курсивом в случае легкой цепи исходного APG мыши (mAPG) (SEQ ID NO:148), IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (IGKV1a) (SEQ ID NO:107) и в случае IGKV1-33-01_IGKJ2-02 (IGKV1b) (SEQ ID NO:150) (см. таблицу 30, ниже). Остатки Vernier, как определено в Foote, et al. *J. Mol. Biol.* 224(2):487-99 (1992), подчеркнуты. Мутации гуманизации (выделенные жирным шрифтом) получали посредством осуществления попарного сравнения двух выровненных последовательностей, исключая CDR и остатки из зоны Vernier (также подчеркнуты в последовательностях mAPG, таблица 30), как определено выше. Никакого дополнительного конструирования в отношении антител APG мыши не осуществляли. Эти гуманизированные антитела называли APGv2 и APGv4.

Последовательности гуманизации APG

APG легкая цепь	D <u>I</u> K <u>L</u> TQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIY SYLSW <u>F</u> QQKP GKSPK <u>T</u> LIYR ANRLIDGVPS RFS <u>G</u> S <u>G</u> S <u>G</u> QD <u>Y</u> SLTISSEY EHMGIYYCLQ YDEF <u>P</u> FTFGS GTKLEIK (SEQ ID NO:148)
APG тяжелая цепь	QV <u>K</u> LQESGPE LVKPGASVKI SCKAS <u>G</u> Y <u>S</u> FT DYNMWVVKQS KGKSLE <u>W</u> IGI IHPNSGTTTTY NQKFKGKAT <u>L</u> T <u>V</u> DQSSSTAY LQLNSLTSED SAVYYC <u>A</u> RSK LRFFDYWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:149)
IGKV1-33- 01_IGKJ4-01 (IGKV1a)	DIQMTQSPSS LSASV GDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK A PKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD F TFTISSE <u>L</u> Q P ED I ATYYCQQ YDNLPLTFGG GTK V EIK (SEQ ID NO:107)
IGKV1-33-01_ IGKJ2-02 (IGKV1b)	DIQMTQSPSS LSASV GDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK A PKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD F TFTISSE <u>L</u> Q P ED I ATYYCQQ YDNLPCSFQ GTKLEIK (SEQ ID NO: 150)
IGHV7-4-1-02_ IGHJ4-03	QVQLVQSG S EL K KPGASVK V SCKASGYTFTSYAMNWVRQ A PGQGLEWMGW INTNTGNPTYAQGFTR F V S LDTSVSTAYLQ I SSL K AEDTAVYYCARxx xxxYFDYWGQGT L VTVSS (SEQ ID NO:151)
IGHV1-46-01_ IGHJ4-03	QVQLVQSG A E V KKPGASVK V SCKASGYTFTSYMHWVRQ A PGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT S TSTV M EL S SL R SED T AVYYCARxx xxxYFDYWGQGT L VTVSS (SEQ ID NO:152)
APGv2_VL2	D <u>I</u> Q <u>L</u> TQSPSS LSASV GDRVT ITCKASQDIY SYLSW <u>F</u> QQKP GK A PK <u>T</u> LIYR AN RLIDGVPS RFS <u>G</u> S <u>G</u> S <u>G</u> QD <u>Y</u> TFTISSE <u>L</u> Q P ED I ATYYC LQ YDEF <u>P</u> FT FGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:153)
APGv2_VH2	QVQLVQSG S E LKKPGASVK V SCKAS <u>G</u> Y <u>S</u> FT DYN MNWVRQ A P GQGLEW <u>I</u> GI IHPNSGTTTTY NQKFKG R AV <u>L</u> S V <u>D</u> QSVSTAY LQ I SSL K AED TAVYYC <u>A</u> RSK LRFFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:154)

APGv4_VH4	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS GYSFT DYN MNWVRQA PGQGLEWI GI IHPNSGTT TY NQKFKGRATL TVDQSTSTAY MELSSLRSED TAVYYC ARSK LRFFDY WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:155)
-----------	---

Сконструированные последовательности

Подходы 4D гуманизации и трансплантации применяли к совпадениям с последовательностями зародышевого типа человека, описанными выше. Что касается сконструированных последовательностей легкой цепи, APGv2 содержит CDR легкой цепи мыши, трансплантированные в последовательность IGKV1-33 зародышевого типа человека (показатель идентичности APGv2 с последовательностью зародышевого типа=94% с IGKV1-33-01_IGKJ2-01). Что касается сконструированных последовательностей тяжелой цепи, APGv2 и APGv4 содержат CDR тяжелой цепи мыши, трансплантированные в последовательностиIGHV7-4-1 и IGHV1-46 зародышевого типа человека, соответственно (показатель идентичности APG_VH2 с последовательностью зародышевого типа=91% с IGHV7-4-1-02_IGHD6-25-01_IGHJ4-02; показатель идентичности APG_VH4 с последовательностью зародышевого типа=91% с IGHV1-46-01_IGHD6-25-01_IGHJ4-02). См. таблицу 30 выше.

Комбинации вариантных последовательностей тяжелой и легкой цепей

Для трансплантации создавали одну версию легкой цепи (APGv2_VL2; SEQ ID NO:153) и две версии тяжелой цепи (APGv2_VH2; SEQ ID NO:154 и APGv4_VH4; SEQ ID NO:155). APG_VL2 содержит 15 мутаций, полученных на основании трансплантации в самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет остатки из CDR и зоны Vernier мыши. APG_VH2 содержит 21 мутаций, полученных на основании трансплантации в самую близкую последовательность зародышевого типа человека с совпадающим каноническим классом, и сохраняет остатки из CDR и зоны Vernier мыши. APG_VH4 содержит 20 мутаций, полученных на основании трансплантации в самую близкую последовательность зародышевого типа человека, и сохраняет остатки из CDR и зоны Vernier мыши. Границы CDR для этого протокола трансплантации были

приблизительными, исходя из многих различных определений, доступных в литературе.

APG_VL2 × APG_VH2 (мутаций, связанные с гуманизацией путем трансплантации с сохранением областей CDR и Vernier)

APG_VL2 × APG_VH4 (мутаций, связанные с гуманизацией путем трансплантации с сохранением областей CDR и Vernier)

В течение этой операции гуманизации получили два варианта mAPG, которые называли APGv2 и APGv4. Эти варианты экспрессировали и определяли их характеристики в нескольких *in vitro* анализах, как описано ниже.

Пример 14: Кинетика сродства для антител APG с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Сродство с гликозилированным PAI-1 человека (GLYNPAI-A, Molecular Innovation) исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для APG мыши и двух гуманизированных вариантов (APGv2 и APGv4) с использованием устройства Biacore 2000 (GE Healthcare, Уппсала, Швеция).

Во-первых, подготовили поверхность сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare, Уппсала, Швеция) с использованием традиционного аминного связывания для захвата антитела к Fc мыши и человека (наборы с антителом к IgG (Fc) человека и антителом к IgG мыши, GE Healthcare). Все моноклональные антитела (mAb) разбавляли до 5 нМ с использованием подвижного буфера HBS-EP. Каждое очищенное mAb захватывали в течение трех минут на поверхности различных проточных ячеек. PAI-1 человека вводили при различных концентрациях (2, 5, 5, 10, 20 и 40 нМ) с короткими периодами диссоциации между ними и длительным периодом диссоциации в конце (время контакта: 120 секунд, короткая диссоциация: 90 секунд; длительная диссоциация: 1800 секунд, скорость потока: 50 мкл/мин.). Чип регенерировали с помощью буфера глицин-HCl, pH 1,7, после каждого цикла связывания антитело-PAI-1. Анализ данных кинетики проводили с использованием Biacore BIAevaluation. Сенсограммы подвергали процедуре двойного контроля путем вычитания значений контрольной проточной ячейки и значений контрольного буфера. Сенсограммы аппроксимировали с

применением имитационной 1:1 модели кинетики (Лэнгмюра) с локальным R_{max} . (См. фигуру 19). Данные для трех антител APG показаны в таблице 31.

Таблица 31

Кинетика связывания с помощью обратного анализа Biacore

Антитело	PAI-1 человека		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	Скорость диссоциации k_d ($1/s$)	Сродство KD (M)
APG	3,82E+06	4,32E-04	1,131E-10
APGv2	6,58E+06	2,69E-04	4,080E-11
APGv4	9,48E+06	3,59E-04	3,800E-11

Пример 15: Определение характеристик антител APG в плазме крови человека

APG мыши и гуманизированные варианты APGv2 и APGv4 подвергали скринингу в отношении их способность блокировать PAI-1 согласно функциональным анализам, раскрытым в данном документе (см., например, примеры 6 и 9, выше). Вкратце, активность PAI-1 оценивали по способности этого белка *serpin* образовывать стабильный комплекс с урокиназой, иммобилизованной на 96-луночных планшетах. После отмывки несвязанного PAI-1 комплексы uPA-PAI-1 обнаруживали с помощью применения поликлональных антител к PAI-1. Затем связанные поликлональные антитела к PAI-1 (количество которых пропорционально содержанию активного PAI-1 в образце) обнаруживали с использованием вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена согласно инструкциям производителя (Molecular Innovation кат. № HPAIKT).

Различные концентрации гуманизированных вариантов APG (APGv2, APGv4) и исходного антитела APG мыши инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре с неразбавленной плазмой крови человек с высоким уровнем активного PAI-1. Уровни оставшегося активного PAI-1 определяли с использованием обнаружения комплекса uPA-PAI-1 с помощью ELISA, как описано выше (см., например, пример 6) и согласно инструкции

производителя.

Ингибирование активности PAI-1 рассчитывали для каждой концентрации mAb. Процентное значение ингибирования активности PAI-1 откладывали на графике в зависимости от концентрации гуманизированных вариантов APG (APGv2, APGv4) или исходного антитела APG мыши. Программное обеспечение Biostat speed применяли для определения IC_{50} и I_{max} после трех независимых экспериментов (в двух повторностях) (см. фигуру 20). Данные представлены ниже в таблице 32.

Таблица 32

Образование плазминогена в плазме крови человека

Антитело	Среднее значение $IC_{50abs} \pm$ sem (нМ)	Среднее значение I_{max} (%)
mAPG	1,81	89,7
APGv2	9,62 E-1	94,5
APGv4	1,28	94,4

Пример 16: Анализ лизиса сгустков в плазме крови человека: активность A44V11, mAPG и вариантов APG

Фибринолитическая система у пациентов с инсультом зачастую подвергается изменениям. Анализ лизиса сгустков можно применять для определения фибринолитической активности путем измерения степени разрушения фибрина. См., в целом, Lindgren, A. *et al.* Stroke 27:1066-1071 (1996). Анализы лизиса сгустков были описаны подробно в другом месте. См., например, Beebe, *et al.* Thromb. Res. 47:123-8 (1987); Tilley *et al.*, J. Vis. Exp. 67:e3822.

Функциональную активность A44V11 и других нейтрализующих антител к PAI-1 определяли с использованием анализа лизиса сгустков в плазме крови человека. Вкратце, в анализе, применяемом в данном документе, образование сгустка вызывали с использованием смеси тканевого фактора/ Ca^{2+} в присутствии tPA и определенной концентрации PAI-1, которая, как известно, ингибирует лизис сгустков. Полимеризация фибрина вызывает повышение значения при турбидиметрическом измерении, что обнаруживали при помощи измерения поглощения при 340 нм. Способность антитела восстанавливать лизис сгустков определяли с

помощью инкубации возрастающих доз антитела с нормальной обедненной тромбоцитами плазмой крови человека.

Вкратце, эксперименты по лизису сгустков осуществляли в титрационных микропланшетах. Плазму крови человека с цитратом (Biopredic International, Ренн, Франция) инкубировали с антителом к PAI-1 или IgG изотипического контроля, разведенным в буфере для анализа (NaCl, Tris-HCl, pH=7,4). После 15 минут инкубации при комнатной температуре добавляли гликозилированный PAI-1 человека (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) до конечной концентрации 3 нМ и инкубировали в течение дополнительных 10 минут. Затем добавляли t-PA (sctPA, Molecular Innovation) до конечной концентрации 1 нМ. Образование сгустка вызывали с помощью смеси для активации, содержащей тканевой фактор (Innovin®, Siemens Healthcare Diagnostics, Марбург, Германия), разведенный до конечной концентрации 7,5 мМ в кальциевом буфере для анализа (CaCl₂).

Считывание кинетики поглощения при 340 нм осуществляли через каждые 30 с в течение 5 часов с помощью считывающего устройства для микропланшетов iEMS (ThermoFischer) или SpectrostarNano (BMG Labtech). Для количественной оценки эффекта на лизис сгустков площадь под кривой (AUC), которая отражает равновесие между образованием сгустков и лизисом сгустков, рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Восстановление лизиса сгустков после обработки антителом определяли согласно следующей формуле:

$$\text{Восстановление} = 100 \times \frac{AUC_{\text{max лизис}} - AUC_{\text{обл}}}{AUC_{\text{отсутствие лизиса}} - AUC_{\text{обл}}}$$

IC₅₀ и I_{max} рассчитывали с использованием программного обеспечения Biostat.

1 нМ концентрация t-PA приводила к полному лизису в нормальной плазме крови в течение 2 часов. 3 нМ концентрация PAI-1 ингибировала индуцированный t-PA лизис сгустков. Добавление либо t-PA, либо PAI-1 отдельно не влияло на образование сгустка. Отсутствие добавления как t-PA, так и PAI-1 не влияло на образование сгустка.

Антитело A44V11 к PAI-1 восстанавливало лизис сгустков в обедненной тромбоцитами плазме крови человека (см. фигуру 21), тогда как изотипический IgG1 не восстанавливал (см. фигуру 22). A44V11 проявляло IC₅₀, составляющую 2 нМ, при этом I_{max} составляла 103% при 100 нМ (см. фигуру 23).

Гуманизированные варианты антитела APG к PAI-1 также восстанавливали лизис сгустков в обедненной тромбоцитами плазме крови человека (см. фигуру 24). APGv2 проявляло IC₅₀, составляющую 2,1 нМ, а I_{max} составляла 114% при 100 нМ. APGv4 проявляло IC₅₀, составляющую 2,8 нМ, а I_{max} составляла 116% при 100 нМ (см. фигуру 25). Данные по лизису сгустков обобщены ниже в таблице 33.

Таблица 33

Ингибирование лизиса сгустков с помощью антитела к PAI-1

Антитело	IC ₅₀ (нМ)	I _{max} при 100 нМ
A44V11	1,38	113%
APG V2	2,08	114%
APG V4	2,82	116%
mAPG	2,34	123%

Пример 17: Оценка нейтрализации PAI-1 при помощи A44V11 в первичных клетках легкого человека

Эффект антитела A44V11 на нейтрализацию PAI-1 исследовали в системе на основе клеток легкого. Считается, что TGFβ является наиболее сильным и универсальным профиброгенным цитокином. Было показано, что TGFβ индуцирует экспрессию PAI-1 и ингибирование активностей t-PA и плазмина, а также распада коллагена в культивируемых эмбриональных фибробластах мыши (клетки NIH3T3). См. Liu, R-M. *Antioxid Redox Signal*. 10(2): 303-319 (2008). Линии первичных фибробластов легкого LL29 (CCL-134) и LL97A (CCL-191) из ATCC (Манассас, Виргиния) выращивали в течение ночи в 12-луночной планшете при концентрации 200000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 48 часов с антителом A44V11 или изотипическим контролем (IgG) и TGFβ (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, кат. № 100-B-001) при концентрации 5 нг/мл. Через 48 часов надосадочные жидкости клеток собирали и анализировали с

помощью вестерн-блоттинга для обнаружения форм PAI-1 с pAb кролика к PAI-1 (abcam, ab66705).

У клеток, обработанных с помощью антитела A44V11 после стимуляции TGF β , полоса PAI-1 выглядела как двойная линия, что соответствует расщепленной форме PAI-1 (см. фигуру 26, дорожка 5). У клеток, обработанных с помощью контрольного IgG, не было отмечено образование такой двойной линии (см. фигуру 26, дорожка 6). Это исследование демонстрирует, что обработка первичных клеток легкого человека с помощью A44V11 приводит к субстратной конформации эндогенного PAI-1, что обеспечивает возможность расщепления PAI-1 с помощью протеазы.

Пример 18: A44V11 повышает активацию MMP

Плазмин может активировать MMP, ферменты которые могут разрушать большинство белков ЕСМ, в том числе коллаген, главный белковый компонент фиброзной ткани. В связи с этим, плазмин часто упоминают в качестве главного активатора MMP. (См. Loskutoff, et al. *J. Clin. Invest.* 106(12):1441-43 (2000)). PAI-1 снижает активацию MMP и разрушение матрикса путем блокирования образования плазмина, с последующим ингибированием апоптоза фибробластов. Способность A44v11 к стимуляции активации MMP исследовали в системе на основе клеток легкого. Первичные фибробласты легкого LL29 (CCL-134) и LL97A (CCL-191) из ATCC (Манассас, Виргиния) выращивали в течение ночи в 12-луночном планшете при концентрации 250 000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 48 часов с A44V11 или изотипическим контролем (IgG) и Lys-плазминогеном (Molecular Innovation, кат. № HGPG-712) при концентрации 0,1 мкМ. Через 48 часов надосадочные жидкости клеток собирали и активности ряда MMP (в том числе, к примеру, MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 и 14) обнаруживали с использованием набора для анализа общих MMP Sensolyte 520 (AnaSpec, Фремонт, Калифорния, кат. № 71158) согласно инструкциям производителя.

Как показано на фигуре 27, A44V11 стимулирует активацию плазмин-зависимых MMP в фибробластах легкого человека. На диаграмме показаны два иллюстративных отдельных эксперимента. У

клеток, обработанных с помощью A44V11 и плазминогена, показана существенно повышенная активация при сравнении с клетками, обработанными с с помощью антитела IgG1 отрицательного контроля. Это исследование демонстрирует, что A44V11 стимулирует активацию ММР в опосредованном плазмином механизме.

Пример 19: Анализ эффективности A44V11 на мышинной модели фиброза легких (провокационная проба с блеомицином)

Экспериментальный фиброз легких, индуцированный с помощью блеомицина, представляет собой хорошо изученную модель фиброгенеза, подтверждаемая в огромном количестве литературных источников. Эта модель легочного фиброза подобна фиброзу, наблюдаемому у человека, и ее применяли для оценки эффектов потенциальных терапевтических средств, а также теоретических исследований. (См., например, Molina-Molina *et al. Thorax* 61:604-610 (2006)).

Исследования фармакодинамики на мышах, обработанных блеомицином (модель фиброза)

Трансгенных мышей, которые экспрессируют PAI-1 человека (трансгенные мыши с гуманизированным PAI-1) получали путем замены CDS (экзоны и интроны) гена (SERPINE1) PAI-1 мыши (рег. № в NCBI NM_008871) на соответствующий CDS гена PAI-1 человека дикого типа (рег. № в NCBI NM_000602.3; NC_000007.13) (см. Klinger, K.W. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8548 (1987)) под контролем эндогенных регуляторных последовательностей гена PAI-1 мыши у мышей C57BL/6×129 (The Jackson Laboratory, Бар Харбор, Мэн). Молекулярное клонирование и получение трансгенных мышей осуществляли согласно традиционным методикам и согласно инструкциям производителя и специалиста по разведению животных. Экспрессию PAI-1 человек и отсутствие экспрессии PAI-1 мышь подтверждали у гомозиготных мышей. Уровни мРНК и белка подтверждали с помощью стандартной qPCR и с помощью ELISA, соответственно. Для данных процедур использовали гомозиготных самок трансгенных мышей с гуманизированным PAI-1 в возрасте 8-9 недель и весом 22-25 г. Грызуном обеспечивали кормом и водой *ad libitum*.

Мыши получали 50 мкл Bleomycin® (Sanofi, Франция),

растворенного в 0,9% NaCl, с помощью внутритрахеального введения посредством микропульверизатора при дозе 2 мг/кг. Контрольные мыши получали 50 мкл 0,9% NaCl. Для этих процедур мышей анестезировали путем ингаляции изофлурана (ТЕМ, Лормонт, Франция) и затем интубировали с помощью канюли 18G. Канюлю присоединяли к аппарату искусственной вентиляции легких со смесью кислород/изофлуран для поддержания анестезии. После анестезии микропульверизатор вставляли в канюлю для введения блеомицина непосредственно в легкие. Затем проводили экстубацию и мышам давали возможность восстановиться от анестезии. В день 4, после рандомизации по 3 группам, мышей обрабатывали однократно путем внутрибрюшинного введения либо A44v11, либо IgG1 мыши в качестве отрицательного контроля из расчета 10 мг/кг в PBS (1 мг/мл).

В обозначенные моменты времени (день 7 или день 9) после провокационной пробы с блеомицином мышей анестезировали с помощью смеси ксилазин/кетамин и умерщвляли с помощью вскрытия грудной клетки. Сбор крови осуществляли путем внутрисердечного сбора в покрытую цитратом пробирку. На левый бронх накладывали зажим и левое легкое извлекали и фиксировали в фиксаторе (FineFix®, Leica Biosystems, Буффало Гроув, Иллинойс) при контролируемом давлении для гистологического анализа. Затем канюлю помещали в трахею для проведения процедуры бронхоальвеолярного лаважа (BAL) (вводили 1,5 мл 0,9% NaCl с помощью трех введений по 0,5 мл и производили сбор). Затем четыре доли правого легкого собирали, разрезали на два кусочка и лизировали для анализа белков. Все эксперименты осуществляли в соответствии с европейскими правилами этичного обращения с животными и они были одобрены внутренним комитетом по этике (CEPAL, sanofi).

Уровни A44V11 определяли с использованием ELISA (Molecular Innovation, кат. № HPAIKT) с помощью планшетов, покрытых биотинилированным PAI-1 человека, и выявляли с использованием вторичного антитела к IgG мыши, меченного sulfo-tag (MesoScale Discovery, Гейтерсбург, Мериленд). В день 7 у мышей, обработанных A44V11, результатом было 200 нМ в плазме крови, 11

нМ в BALF и 12 нМ в лизате легкого.

Как показано на фигуре 28, при внутрибрюшинном введении однократной дозы (10 мг/кг) A44V11 в день 4 достигалось практически полное ингибирование активного PAI-1 человека как в жидкости BAL, так в лизате легкого у животных, умерщвленных в день 7 после провокационной пробы с блеомицином. Что касается животных из группы день 9, с помощью A44V11 (10 мг/кг) достигалось практически полное ингибирование активного PAI-1 человек в лизатах легкого, но достигалось только частичное ингибирование в BALF.

D-димеры, продукт распада фибрина, можно измерять для оценки степени разрушения фибрина. Для измерения распада фибрина уровни D-димера в BALF определяли с помощью ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago, Анжер, Франция) согласно инструкциям производителя. Уровни D-димера в BALF у группы, обработанной A44V11, повышались приблизительно в 2,8 раза в день 7 и в 1,6 раз в день 9 при сравнении с группой отрицательного контроля с обработкой IgG1, что позволяет предположить, что обработка A44V11 повышает распад фибрина (см. фигуру 29).

Дополнительные исследования осуществляли для дополнительной оценки активности A44V11 в снижении фиброза в легком мыши при провокационной пробе с блеомицином. Для этих исследований мышей подвергали аналогичному протоколу для исследования фармакодинамики, описанному выше, за исключением того, что продолжительность времени исследования составляла 21 день после провокационной пробы с блеомицином, а обработку антителом (либо A44V11, либо контрольным антителом IgG1 из расчета 10 мг/кг) повторяли через каждые 3 дня, начиная с дня 4 до дня 20. В день 21 после провокационной пробы с блеомицином животных умерщвляли, как описано выше.

Увеличение массы легкого, как известно, является показателем повышенного фиброза. Массу правого легкого, в качестве количественной оценки фиброза, определяли для мышей во всех экспериментальных группах. Как показано на фигуре 30, инстиляция блеомицина вызывает повышение массы правого легкого, что частично ингибировалось повторным введением доз антитела

A44V11 из расчета 10 мг/кг. Повторное введение доз антитела IgG1 отрицательного контроля не приводило к ингибированию повышения массы правого легкого, обусловленного провокационной пробой с блеомицином. Уменьшение индуцированного блеомицином повышения массы правого легкого у мышей, обработанных A44V11, было статистически значимым при сравнении аналогичными индуцированными блеомицином мышами, которых обрабатывали с помощью антитела IgG1 отрицательного контроля ($p < 0,001$). Статистический анализ осуществляли с помощью однофакторного ANOVA с последующим применением критерия Ньюмена-Кейлса. Этот результат указывает на то, что A44V11 ингибирует индуцированный блеомицином фиброз в легком мышей с гуманизированным PAI-1, тогда как контрольное антитело IgG1 не ингибирует.

Накопление коллагена в легком является другим известным показателем фиброза. Для анализа накопления коллагена ткани легкого от мышей, умерщвленных в день 21, готовили и разделяли с помощью HPLC, с последующим измерением гидроксипролина. Эту методика подробно описана в другом месте, к примеру, у Hattori, *et al. J Clin Invest.* 106(11):1341-1350 (2000). Вкратце, ткань легкого готовили с помощью гидролиза в кислотных условиях (6M HCl) в течение 22 часов при 105°C, с последующим выпариванием. Первичные амины блокировали в ткани легкого с помощью ОРА (фталевый альдегид), и пролин/гидроксипролины специфически метили с использованием NBD (4-хлор-7-нитробензофуран) (Santa Cruz Biotech., Санта-Круз, Калифорния). Гидролизаты затем разделяли на колонках Synergi™ 4 мкм Hydro-RP 80Å, колонка для LC 150×3 мм (Phenomenex, Торренс, Калифорния, кат. № 00F-4375-Y0) с использованием HPLC (Shimazu Corp., Киото, Япония) при градиенте ацетонитрила. Калибровочные кривые с известными количествами гидроксипролина применяли в качестве эталонной величины для количественной оценки пика(ов). Представление количественных данных показано на фигуре 31.

Накопление коллагена в легком, как обнаружено с помощью содержания гидроксипролина, повышалось у животных, подвергнутых провокационной пробе с блеомицином. Это повышение накопления

коллагена в легком статистически снижалось ($p < 0,08$) при повторном введении доз антитела A44V11 из расчета 10 мг/кг. (См. фигуру 31). Повторное введение доз антитела IgG1 отрицательного контроля не приводило к ингибированию повышения накопления коллагена в легком, обусловленного провокационной пробой с блеомицином. Уменьшение индуцированного блеомицином повышения накопления коллагена в легком у мышей, обработанных A44V11, было статистически значимым при сравнении аналогичными индуцированными блеомицином мышами, которых обрабатывали с помощью антитела IgG1 отрицательного контроля ($p < 0,05$). У мышей, обработанных A44V11, показано приблизительно на 44% меньшее повышение накопления коллагена, чем у мышей, обработанных контрольным IgG1.

Пример 20: Оценка активности A44V11 на модели с провокационной пробой LPS у обезьян

Острую модель с провокационной пробой липополисахаридом (LPS) у обезьян применяли для определения эффективности нейтрализации PAI-1 с помощью A44V11 *in vivo*. Модель с провокационной пробой LPS описана у Hattori, et al. *J Clin Invest.* 106(11):1341-1350 (2000). Оценивали активность mAb A44V11 в отношении PAI-1 в плазме крови и образцах печени обезьян. А именно, эксперимент разрабатывали для оценки воздействия высокой дозы LPS (100 мкг/кг - IV) на уровни PAI-1 в плазме крови и тканях у подвергнутых анестезии обезьян, предварительно обработанных (за 24 часа) либо A44V11 (5 мг/кг, IP), либо IgG1 (отрицательный контроль, 5 мг/кг, внутрибрюшинное введение). Эксперименты осуществляли в соответствии с европейскими правилами этического обращения с животными и они были одобрены внутренним комитетом по этике (CEPAL, sanofi).

Макаков-крабоедов *Macaca fascicularis* (самцы и самки) весом 4-9 кг, не кормили на протяжении ночи перед проведением долгосрочной анестезии (по меньшей мере 8 часов), включающей IM индукцию с помощью Zoletil 50 (Virbac, Тагиг Сити, Филиппины) из расчета 0,12-0,16 мл/кг, с последующей ингаляцией газообразной смеси воздух/кислород и изофлуран (1-3%). Температуру тела обезьяны поддерживали в рамках физиологических значений с

использованием грелки-подушки. После введения катетера LPS (серотип 0127-B8) вводили в виде 1 мин. болюса в головную добавочную вену при дозе 100 мкг/кг (0,4 мл/кг). В различные моменты времени обирали образцы крови и образцы печени. Образцы крови (цитрат/EDTA) собирали и центрифугировали для выделения обедненной тромбоцитами плазмы крови. Биоптаты печени и материал терминальной некропсии хранили при -80°C .

Уровни активного PAI-1, D-димера и плазмина- $\alpha 2$ антиплазмина определяли с использованием коммерчески доступных анализов ELISA (Mol. Innovation, кат. № HPAIKT; Asserachrom D-Dimer; Plasmin-A2 antiplasmin, Diagnostica Stago) согласно инструкциям производителя.

В плазме крови уровень активного PAI-1 снижался от приблизительно 30 нг/мл до ниже 10 нг/мл у всех обезьян, которым вводили A44v11. (См. фигуру 32(A)). Не наблюдали повышение уровней активного PAI-1 после введения LPS (100 мкг/кг). (См. фигуру 32(A)). Напротив, у мышей, обработанных IgG1 отрицательного контроля, показано сильное повышение уровней активного PAI-1 после введения LPS, при этом максимум наблюдался через примерно 4 часа (приблизительно от 50 до примерно 250 нг/мл). (См. фигуру 32(B)). Таким образом, обработка IgG1 отрицательного контроля не снижает уровни активного PAI-1 в плазме крови, которые были сильно повышенными после введения LPS. (См. фигуру 32(B)).

В лизатах биоптатов печени наблюдали аналогичную ситуацию. У обезьян, которых обрабатывали mAb A44V11, не отмечено повышение уровней активного PAI-1 после обработки с помощью LPS. (См. фигуру 33(A)). Напротив, введение LPS приводило к сильному повышению активного PAI-1 (вплоть до 3 нг/мг) в лизатах биоптатов печени из обезьян, обработанных IgG1 отрицательного контроля (см. фигуру 33(B)).

Одновременно с нейтрализацией PAI-1 обнаружили, что уровни D-димера у обезьян, обработанных A44V11 (см фигуру 34(A)), в целом были выше, чем у обезьян, обработанных IgG отрицательного контроля (см. фигуру 34(B)), что, таким образом, позволяет

предположить, что обработка A44V11 у обезьян также вызывает повышение распада фибрина в плазме крови.

Наконец, в образцах плазмы крови обезьян, обработанных A44V11, показан повышенный уровень комплексов плазмин- $\alpha 2$ антиплазмин (РАР) при сравнении с уровнями РАР у обезьян, обработанных IgG отрицательного контроля. (См. фигуру 35(А) и (В)). Повышение содержания комплекса РАР и D-димера в присутствии A44V11 указывает на повышение образования плазмина.

Пример 21: Оценка активности A44V11 на мышинной модели спаек в брюшной полости

Эффект обработки антителом к PAI-1 A44V11 на образование спаек оценивали на мышинной модели хирургического повреждения рогов матки. Сближение рогов матки у мыши и процедура электрокаутеризации нарушают поверхность серозной оболочки, вызывают тепловое повреждение ткани матки и сближают поверхности поврежденных тканей во время процесса заживления, что в конечном итоге приводит к образованию послеоперационных спаек у 100% у не подвергавшихся обработке животных. Модель и хирургическая процедура были описаны ранее у Haney A.F. et al., (1993). *Fertility and Sterility*, 60(3): 550-558.

Для этих исследований образования спаек использовали самок трансгенных мышей, полученных выше, у которых экспрессировался трансген гуманизированного PAI-1, возрастом приблизительно 9, весом приблизительно 20 г. Сорок две зрелые самки трансгенных мышей разделяли на две группы и подвергали хирургической процедуре, разработанной для создания спаек между рогами матки (UH), как подробно описано у Haney A.F. et al., (1993). Вкратце, каждое животное анестезировали с помощью изофлурана для проведения операции согласно методическим указаниям IACUC, и стандартную срединную лапаротомию проводили приблизительно на 1,0 см каудальнее от мечевидного отростка. UH выявляли, сближали медиально с помощью одного шовного материала Prolene 7-0 (Ethicon Inc., Сомервилл, Нью-Джерси), аккуратно проходящего через мышечную стенку каждого рога, и рога связывали вместе непосредственно ниже места присоединения яйцеводов в маточно-

трубном сочленении. Действовали осторожно, чтобы не повредить систему кровоснабжения яичников. Для индуцирования повреждения с помощью электрокаутера применяли биполярный электрокаутерный аппарат (Valley Lab Surgistat, полупроводниковый аппарат для электрохирургии, модель № В-20) на медиальной поверхности каждого рога матки, покрывая участок размером приблизительно 2х6 мм. Каутерный аппарат имел следующие установки: 100 Вольт, 130 Гц, 50– 60 Ампер. Наконечник каутера шириной 3 мм применяли с чистым коагулирующим током в положении 3, подавали питание, и прикасались к ткани в течение 1 секунды в двух точках нанесения ожога на рог. Разрез мышц зашивали с помощью викрила 5-0, колющей иглы BV-1 (Ethicon Inc.) по схеме непрерывного шва. Кожу зашивали с помощью Prolene 5-0, колющей иглы BV-1 (Ethicon Inc.), по схеме горизонтального матрасного шва.

После создания повреждения УН животных группы 1 обрабатывали при помощи антитела изотипического контроля (30 мг/кг) в объеме 0,16 мл, которое наносили на ожоги, полученные после каутеризации. Животных группы 2 обрабатывали при помощи антитела А44V11 (30 мг/кг) в объеме 0,16 мл тем же самым способом. Что касается каждой группы, животных подвергали эвтаназии через 6 часов (n=5), 72 часа (n=4) или в день 7 (n=12). (См. таблицу 34 ниже). Животным, у которых эвтаназия планировалась через 72 часа или в день 7, давали вторую дозу антитела (30 мг/кг), инъецируемую внутрибрюшинно (IP) через 48 часов после операции.

Таблица 34

Схема обработки для исследований с повреждением рога матки

Группа	Обработка	Момент времени эвтаназии	Число животных	Введение дозы (30 мг/кг)
Группа 1	mAb изотипического контроля (0,16 мл)	6 часов	5	Время 0
		72 часа	4	Время 0+48 часов
		День 7	12	Время 0+48 часов

Группа 2	Гуманизированное mAb A44 к PAI-1 (0,16 мл)	6 часа	5	Время 0
		72 часа	4	Время 0+48 часов
		День 7	12	Время 0+48 часов

Примечание: У всех животных рога матки сближали с помощью шовного материала и ожоги путем коагуляции создавали перед обработкой.

Оценка и анализ эффективности:

Животных подвергали эвтаназии в указанные моменты времени и оценивали образование спаек. Вкратце, длину рогов измеряли от места бифуркации матки до сближающего шва сразу под яйцеводами. Два наружных шовных материала, окружающие рога матки удаляли и длину спайки между рогами матки измеряли с помощью микроскопа, документировали и отмечали как присутствующую или отсутствующую (да/нет). Также, любые ткани, вовлеченные в образование спаек, следует регистрировать, но можно не включать в длину спаечного участка. Распределение среднего процентного значения длины спайки между рогами матки проверяли в отношении нормальности с использованием критерия Шапиро-Уилка. Группы сравнивали друг с другом с использованием анализа Тьюки-Крамера, в случае нормального распределения, и анализа суммы рангов Уилкоксона, в случае отсутствия нормального распределения. Во всех случаях, p -значение $\leq 0,05$ считали статистически значимым. У животных, обработанных A44V11, показано значительно более низкое процентное значение длины образованных спаек между сближенными рогами матки (см. таблицу 35)

Таблица 35

Результаты измерения длины рогов матки

Группа	N	% длины со спайками между рогами матки (Среднее значение $\pm$ SEM)
mAb изотипического контроля (0,16 мл)	12	84 $\pm$ 3

mAb A44V11 (0,16 мл)	11	61±7* (p=0,02)
-------------------------	----	-------------------

*p= статистическая значимость относительно изотипического контроля при анализе суммы рангов Уилкоксона, приближение по критерию хи-квадрат.

Определение уровней активного PAI-1 и tPA

После эвтаназии у животных для оценки собирали кровь (плазму крови), внутрибрюшную жидкость (IPF) и образцы рогов матки. Сбор образцов осуществляли с использованием традиционных методик. Плазму крови, IPF и образцы рогов матки оценивали в отношении уровней активного PAI-1 и tPA с использованием ELISA. (наборы ELISA для определения активности PAI-1 человека, кат. № HPAIKT, Molecular Innovations, Нови, Мичиган). Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Excel, JMP и Prism Graph pad. Во всех случаях, p-значение $\leq 0,05$ считали статистически значимым. В моменты времени 6 часов и день 7 сниженные уровни активного PAI-1 обнаруживали в IP-жидкости и лизатах рогов матки у животных, обработанных с помощью A44V11, в сравнении с обработанными изотипическим контролем. (См. фигуру 36). Сниженные уровни активного PAI-1 в IPF через 6 часов представляли собой статистически значимый результат, продемонстрированный в IP-жидкости в момент времени 6 часов у животных, обработанных с помощью A44, в сравнении с обработанными изотипическим контролем ($p < 0,001$ согласно Т-критерию Стьюдента).

Пример 22: Кристаллическая структура гуманизированного антитела A44V11

Экспрессия и очистка Fab A44V11

Рекомбинантный Fab (rFab) получали от временно трансфицированных клеток HEK293, с использованием двух плазмид, кодирующих легкую цепь или С-концевую часть тяжелой цепи с His-меткой. После центрифугирования и фильтрования rFab из надосадочной жидкости клеток наносили на смолу для афинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла. После элюирования из смолы rFab подвергали тщательному диализу против

PBS и хранили при 4°C.

Источник PAI-1 Macaca fascicularis, называемого как PAI-1 яванского макака или макака-крабоеда:

Рекомбинантный зрелый PAI-1 яванского макака (24-402) экспрессировали в качестве телец включения в *E. coli* и рекомбинантный белок очищали с использованием традиционных способов.

Источник PAI-1 человека:

Рекомбинантный зрелый PAI-1 человека (24-402) приобретали у Molecular Innovations Inc. (каталожный номер CPAI). Он был стабилизированным в активной конформации путем введения мутаций (N150H, K154T, Q319L, M354I), как описано у Berkenpas et al. (1995, EMBO J., 14, 2969-2977).

Получение и очистка комплексов:

Рекомбинантный Fab и антиген смешивали при молярном соотношении 1,5:1, инкубировали 30 минут при комнатной температуре и комплексы подвергали дополнительной очистке с помощью препаративной гель-фильтрации на колонке Superdex 200 PG (GE Healthcare), уравновешенной 25 mM MES, pH 6,5, 150 mM NaCl.

Кристаллизация комплекса Fab A44V11+PAI-1 макака-крабоеда

Комплекс концентрировали до 10 мг/мл в 25 mM MES, pH 6,5, 150 mM NaCl. Его кристаллизовали в 16-24% этаноле, 100 mM Tris, pH 8,5. Этиленгликоль (30%) применяли в качестве криопротектора. Дифракцию на кристаллах осуществляли до примерно 3,3 Å в кристаллографической группе P321 (a=b=193 Å, c=144 Å) на канал синхротронного излучения ID29 ESRF. Данные обрабатывали с помощью комбинации XDS и Scala (GlobalPhasing Ltd., Кембридж, Великобритания)

Определение структуры комплекса Fab A44V11/PAI-1 макака-крабоеда:

Модель варибельного домена Fab конструировали с использованием Prime in Maestro (Schrodinger, Нью-Йорк, Нью-Йорк). Константный домен получали из опубликованной структуры 3FO2. Применяли две различные модели PAI-1 человека: неактивную конформацию получали на основе 1LJ5, активную конформацию на

основе 10С0. Подсчет коэффициента Мэтьюса (V_m , объем кристалла на единицу молекулярной массы белка) позволил предположить существование до четырех комплексов в асимметричной ячейке (V_m 2, 2 допускает размер комплекса, составляющий 90 килодальтон (KD). Молекулярное замещение проводили с использованием Phaser (пакет программ CCP4) (McCoу, *et al.* *J. Appl. Cryst.* 40: 658–674 (2007), с помощью чего выявили два мономера неактивного PAI-1 и два переменных домена Fab. Дополнительная плотность была явно заметной для константных доменов, которую необходимо было размещать вручную. Это решение, которое соответствовало значению V_m 4,3 (71% растворителя), также тщательно проверяли в отношении согласованности упаковки. Структуру дорабатывали с помощью Buster (GlobalPhasing) с использованием некристаллографической симметрии, до Rfree 29,2% (Rfactor 25,8%). Константные домены не стабилизируются при упаковке кристалла и слабо выражены на карте электронной плотности.

Кристаллизация комплекса Fab A44V11+PAI-1 человека

Кристаллизация белка представляет собой "узкое место" в определении структуры биомолекул с помощью способов рентгеновской кристаллографии. Успех в кристаллизации белка прямо пропорционально связан с качеством белковых молекул, используемых в экспериментах по кристаллизации, где наиболее важными критериями качества являются чистота и однородность (как молекулярная, так и конформационная) белков в растворе.

Первоначально, для определения структуры комплекса PAI-1/Fab mAb применяли нативный mAb A44 для получения его Fab-фрагмента путем расщепления папаином. Это получение Fab в увеличенном масштабе приводило к гетерогенным Fab-фрагментам, которые вводили в комплекс и очищали в комплексе белком PAI-1 человека дикого типа (wt). Полученный белковый комплекс концентрировали до концентрации 7 мг/мл и проводили скрининг в отношении кристаллизации при 800 индивидуальных условиях кристаллизации при двух различных температурах, 4°C и 19°C. Было отмечено отсутствие успешных кристаллизаций. Для улучшения гомогенности белковых комплексов рекомбинантный Fab A44 с меткой

6-His получали, очищали и объединяли в комплекс с белком PAI-1 человека дикого типа (см. фигуру 36).

Комплексный скрининг кристаллизации привел к первым успешным кристаллизациям при условиях 20%PEG10K+0,1M натрий ацетат, pH 4,6. Оптимизация кристаллизации с помощью традиционных способов кристаллизации, метода микропереноса кристаллов и кристаллизации трипсинолизисом *in situ*, существенно не улучшили качество кристаллов. Наилучшие полученные кристаллы были иглообразными и характеризовались дифракцией рентгеновских лучей при разрешении, недостаточном для определения структуры ($10\text{\AA}$).

Неудачу с кристаллизацией комплексных кристаллов, вероятно, можно было объяснить конформационной неоднородностью комплексов. Молекула PAI-1 дикого типа, как известно, принимает три отдельные конформации (активную, неактивную и субстратную), которые могут препятствовать кристаллизации. Для улучшения качества кристаллов получали Fab A44 с меткой 6-His в комплексе с неактивным PAI-1. (См. фигуру 37).

Соответствующий комплекс получали и подвергали скринингу в отношении кристаллизации *de novo* и при условиях, ранее используемых для комплекса Fab A44 с меткой 6-His/белок PAI-1. Идентифицировали только одну успешную кристаллизацию из более чем 1000 протестированных условий для комплекса при условиях 20% PEG3350+0,2M pH4 ацетат +4% MPD+50 mM Mes, pH 6 (см. фигуру 39(a)). После интенсивной оптимизации получали 3D кристаллы. Тесты с дифракцией рентгеновских лучей с использованием канала синхротронного рентгеновского излучения высокой интенсивности показало отсутствие признаков дифракции (см. фигуру 39(b), изображающую типичные оптимизированные кристаллы).

Для снижения гибкости частей белка решили получить Fab-фрагмент A44 рекомбинантно, но без искусственной метки, такой как ранее используемая метка 6-His. Для дополнительного повышения шансов успешной кристаллизации активную форму мутантного PAI-1 (N150H, K154T, Q319L, M354I) приобретали у Molecular Innovations (кат. № CPAI, Нови, Мичиган) и

использовали для получения комплексов с белком Fab A44 без искусственной метки. Комплекс концентрировали до 12 мг/мл в 25 mM MES, pH 6,5, 150 mM NaCl. Получали приемлемые палочкообразные одиночные кристаллы в 10% PEG3350, 100 mM сульфате аммония и криопротекцию проводили путем добавления 30% этиленгликоля (см. фигуру 40). Дифракцию на кристаллах осуществляли до разрешения примерно 3,7 Å, и после интенсивной оптимизации криопротекции, приводило к набору данных рентгеновской дифракции, подходящему для определения структуры (3,3 Å). Набор данных собирали до 3,3 Å при канале излучения Proxima 1 синхротрона SOLEIL (Сент-Обен, Франция). Пространственная группа представляла собой P212121 (a=105, b=152 c=298). Данные обрабатывали с использованием сценариев XDSme (XDS ref, Xdsme ref).

Определение структуры комплекса Fab A44V11/PAI-1 человека:

Pointless (CCP4) выявил только 40% надежность в идентификации пространственной группы. Вследствие этого, начальное молекулярное замещение проводили с помощью Amore (CCP4) для тестирования всех возможных вариантов пространственной группы из целевой группы P222: P212121 однозначно подтвердилась. Конечное молекулярное замещение с помощью Phaser (Phaser, CCP4) выявило четыре димера активный PAI-1/вариабельный домен Fab в асимметричной ячейке. Константные домены добавляли вручную на карте электронной плотности. Структуру дорабатывали с помощью Buster (GlobalPhasing) с использованием некристаллографической симметрии, до Rfree 28% (Rfactor 24,1%).

Анализ структуры эпитопа и паратопа

Область эпитопа и паратопа выявляли как сформированную в комплексах с белком макака-крабоеда и человека, и комплексы сравнивали. Структуру кристаллов определяли до 3,3 Å для A44V11 в комплексе с PAI-1 человека и макака-крабоеда. Совмещение обеих структур (см. фигуру 40) показано, что паратоп A44V11 является аналогичным в случае как неактивной, так и активной форм PAI-1. Fab A44 распознавал активную форму PAI-1 человека и неактивную форму PAI-1 макака-крабоеда. На фигуре 42 показан эпитоп PAI-1,

распознаваемый Fab A44 в случае как активного PAI-1 человека (фигура 42(A)), так неактивного PAI-1 макака-крабоода (фигура 42(B)). Распознавание паратопом неактивной конформации является частью распознавания паратопом активной конформации.

PAI-1 преимущественно взаимодействует с тяжелой цепью A44V11, как можно увидеть из анализа взаимодействия участков поверхности. Участок поверхности взаимодействия между активным PAI-1 человека и тяжелой цепью (среднее для 4 комплексов) составляет 674 Å². Участок поверхности взаимодействия между активным PAI-1 человека и легкой цепью (среднее для 4 комплексов) составляет 372 Å². Участок поверхности взаимодействия между неактивным PAI-1 макака-крабоода и тяжелой цепью (среднее для 2 комплексов) составляет 703 Å². Участок поверхности взаимодействия между неактивным PAI-1 макака-крабоода и легкой цепью (среднее для 2 комплексов) составляет 360 Å². См. фигуры 43 и 44, изображающие паратопы тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно.

Остатки в части паратопа A44V11 показаны ниже в таблице 36. Остатки, обозначенные курсивом, вовлечены во взаимодействия с активным PAI-1, но не с неактивной формой, при этом подчеркнутые остатки взаимодействуют только с неактивной формой. Все остальные остатки вовлечены в обе поверхности контакта.

Таблица 36

Остатки A44V11, входящие в состав паратопа, взаимодействующего с PAI-1

Расположение	остатки
Тяжелая цепь (фигура 43)	
Петля H1	Thr30, Asn31, Gly32, Tyr33 и Asn35
Петля H2 и соседние β-нити	Tyr47, Tyr50, Thr52, Tyr53, Ser54, <u>Gly55</u> , Ser56, Thr57 и Tyr58
Петля H3	Trp98, Tyr100 и Tyr104
Легкая цепь (фигура 44)	
Петля L1:	Asn30 и Tyr32

Петля L2:	Arg50 и Arg53
Петля L3:	Tyr91, Asp92, Glu93, Phe94 и Pro96

Несмотря на различные конформации молекул PAI-1 человека и макака-крабоода, одинаковые остатки вовлечены во взаимодействие с Fab A44 (остатки, выделенные жирным шрифтом, показанные ниже в последовательности PAI-1 человека) (SEQ ID NO:1):

VNHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVVFSYPYGVASVLAMLQLTTGG**ETQQ**IQ
AAMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMPHFFRFLRSTVKQ
VDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISHLLGTGAVDQ**LT**RLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSSTHRR
LFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEVPLSALT
NILSAQLISHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLG**MTDMFRQFQADFTSLSDQEPL**
HVALALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIIDRPFLFVVRHNPTGTVLFMGQVMEP

Условное обозначение для связывающего A44V11 эпитопа для PAI-1 человека является следующим:

E-X-X-Q (SEQ ID NO:156);

L-X-R (SEQ ID NO:157);

T-D-X-X-R-Q-F-Q-A-D-F-T-X-X-S-D-Q-E-P-L (SEQ ID NO:158)

Таким образом, эпитопы PAI-1 макака-крабоода и человека, распознающие FabA44, являются идентичными в обеих конформациях. Fab A44 распознает PAI-1 как человека, так и макака-крабоода, но, вероятно не PAI-1 мыши или крысы.

Пример 23: Определение специфичности и перекрестной реактивности A44V11

Для определения специфичности и реактивности A44V11 последовательность эпитопа A44V1 (см. выше) использовали для поиска сходных эпитопов в других белках с применением поиска мотива с помощью базы данных ScanProsite (SIB, Швейцарский институт биоинформатики). Для получения дополнительной информации см. Artimo, P. et al. Nucleic Acids Res. 40(W1):W597-603 (2012). Все из совпадений с последовательностями эпитопов, обнаруживаемые при поиске, соответствовали PAI-1, предполагая, что антитело A44V11 является специфичным к PAI-1.

Эпитоп A44V11 также сравнивали с другими известными рентгеновскими структурами (3D-поиск) с применением анализа профиля *in silico* и молекулярного моделирования в соответствии с

Med-SuMo, который обеспечивает обнаружение и сравнение биохимических функций на поверхностях белков, включая, например, водородные связи, заряды, гидрофобные и ароматические группы. Молекулярное моделирование Med-SuMo дополнительно описано в Jambon, et al. *Bioinformatics* 21(20):3929-30 (2005). 3D-поиск эпитопа A44V11 обеспечивал обнаружение сходного мотива в альфа-1-антитрипсине человека (AAT1). Однако при дальнейшем исследовании было обнаружено, что мотив AAT1 обладает значительными отличиями относительно эпитопа A44V11, с которым A44V11, скорее всего, не может связываться. Следовательно, анализ профиля последовательности и 3D-профиля эпитопа A44V11 дает возможность предположить, что может иметь место минимальная перекрестная реактивность с другими белками человека.

Эпитопы PAI-1 человека и макака-крабоода для A44V11 сравнивали с предложенными эпитопами PAI-1 мыши и крысы. Последовательности выписаны из SEQ ID NO:1 (PAI-1 человека), SEQ ID NO:162 (PAI-1 макака-крабоода), SEQ ID NO:163 (PAI-1 мыши) и SEQ ID NO:164 (PAI-1 крысы). PAI-1 крысы и мыши характеризуются, соответственно, 75% и 79% идентичностью последовательности с PAI-1 человека. Выравнивание различных последовательностей PAI-1 демонстрируют значительные различия между последовательностями крысы/мыши и человека/макака-крабоода в их соответствующих эпитопах, подтверждая, что A44V11, вероятно, не распознает PAI-1 крысы или мыши (см. фигуру 45). Например, аминокислоты Ser300, Thr302, Gln314 PAI-1 мыши отличаются от аналогов PAI-1 человека/макака-крабоода. Различия в данных остатках представляют изменение в предложенных эпитопах, так что PAI-1 мыши не может распознаваться A44V11. Сравнение структуры PAI-1 мыши со структурой комплекса PAI-1/A44V11 человека (фигура 46) дополнительно указывает на то, что получение активности антитела A44V11 в отношении как человека, так и мыши может быть невозможным.

Для дальнейшей проверки идентифицированного эпитопа в отношении A44V11 эпитопы A44V11 человека и макака-крабоода сравнивали со связывающими областями вибронектина. была опубликована структура PAI1 человека в комплексе с соматомедин

В-подобным доменом вибронектина (1OC0). Структуры данных двух комплексов сравнивали (см. фигуру 47). Структурное сравнение предполагает, что связывание A44V11 не будет оказывать влияния на взаимодействие PAI-1 с вибронектином.

Эпитоп A44V11 сравнивали с эпитопами других опубликованных анти-PAI1-антител. Не было обнаружено перекрывания эпитопов A44V11 с другими опубликованными анти-PAI-1-антителами MA-55F4C2 и MA-33H1, которые связывают остатки в области 128-156 (см. Debrock et al. *Thromb Haemost*, 79:597-601 (1998)).

Наконец, специфичность и отсутствие перекрестной реактивности антитела A44V11 антитело были подтверждены Biacore. На основании предсказанной уникальной последовательности и 3D-структуры эпитопа A44V11 исследования молекулярного моделирования убедительно указывают на то, что A44V11 является специфичным для PAI-1 человека и макака-крабоеда.

Пример 24: Картирование эпитопов с помощью масс-спектрометрии, основанной на водородно-дейтериевом обмене (HDX MS)

Водородно-дейтериевый обмен (HDX), контролируемый с помощью масс-спектрометрии (MS), применяли в отношении PAI-1-связывающих антител, раскрытых в данном документе, для дальнейшей характеристики эпитопа каждого антитела. HDX MS является особенно применимой технологией для сравнения нескольких состояний одного и того же белка. Подробная методика и применения HDX MS в отношении терапевтических средств на основе белка раскрыты в Wei, et al., *Drug Discovery Today*, 19(1): 95-102 (2014). Вкратце, если водный, полностью на основе H₂O, растворитель замещают изотопом водорода, который характеризуется отличными спектроскопическими свойствами, то можно отслеживать данный процесс обмена. Для более современных HDX-экспериментов используют дейтерированную или "тяжелую" воду (D₂O). В частности, водород, связанный с азотом остова (также называемый амидным водородом остова) является применимым для зондирования конформации белка. См., например, Marcsisin, et al. *Anal Bioanal Chem.* 397(3): 967-972 (2010). Поверхностные и динамические области белков будут быстро осуществлять обмен, в то время как

защищенные и жесткие области белков будут осуществлять обмен медленнее. Все из соответствующих состояний (рН, температура, ионная сила и т.д.) остаются константными, так что только различие в структуре (доступность для растворителя, связывание водорода) осуществляет влияние на данный обмен. Взаимодействие антитела с PAI-1 будет блокировать мечение определенных частей антигена, таким образом производя отличную считываемую величину в зависимости от сайта связывания (эпитоп).

Экспериментальный способ

Маточные растворы PAI-1 макака-крабоведа (10 мкМ), PAI-1 макака-крабоведа, связанного с A44v11 (10 мкМ каждый), и PAI-1 макака-крабоведа, связанного с APGv2 (10 мкМ каждый), готовили в PBS, рН 7,2. Растворам белка давали достичь равновесия связывания путем инкубирования в течение 1 часа при комнатной температуре. На основании значения $K_d < 50$ пМ, каждый из комплексов антитело:антиген достигал $>99\%$ связывания при состояниях мечения, описанных ниже.

Дейтериевый обмен, гашение и инъекцию образца осуществляли с помощью автоматизированной робототехнической системы (LEAP Tech., Каррборо, Северная Каролина). Аликвоту раствора белка разводили в 10 раз буфером для мечения (PBS в 99,9% D_2O , рD 7,2) и оставляли инкубироваться при 20°C в течение 10 с, 1 мин., 5 мин., или 4 часов. По завершению момента времени дейтериевого обмена реакцию мечения гасили путем добавления 50 мкл раствора для мечения к равному объему предварительно охлажденных (0°C) 100 мМ фосфата натрия, 4 М гидрохлорида гуанидина, 0,5 М ТСЕР, рН 2,5. Недейтерированные контроли готовили идентичным способом путем разведения в 10 раз PBS в H_2O .

Каждый гашенный образец (50 мкл, 50 пмоль каждого белка) сразу же инъецировали в Waters nanoAcquity с технологией HDX (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс). Белки расщепляли в реальном времени с помощью 2,1 мм × 30 мм пепсиновой колонки Enzymate BEN (Waters Corp.), которую выдерживали при 20°C. Все из хроматографических элементов выдерживали при $0,0 \pm 0,1^\circ C$ в камере охлаждения системы сверхвысокоэффективной жидкостной

хроматографии (UPLC). Полученные пептиды задерживали и обессоливали в течение 3 мин. при скорости 100 мкл/мин. и затем разделяли на 1,0×100,0 мм колонке HSS T3 ACQUITY (Waters Corp.) в течение 12 мин. с градиентом ацетонитрил:вода 2-40% при скорости 40 мкл/мин. Уровни дейтерия не корректировали с учетом обратного обмена и регистрировали как относительные. Все эксперименты сравнения осуществляли при идентичных условиях, отвергая потребность в коррекции с учетом обратного обмена. Все эксперименты выполняли в трех повторностях. Перенос пептида из предыдущих проб между инъекциями исключали с помощью инъекирования 50 мкл 1,5 М гидрохлорида гуанидина, 0,8% муравьиной кислоты и 4% ацетонитрила во все колонки после каждого прогона.

Масс-спектры получали с помощью устройства Waters Synapt G2-Si, оснащенного стандартным источником электрораспыления (Waters Corp.), работающим в режиме HDMSe. Настройки устройства были следующими: капиллярная колонка на 3,5 кВ, пробоотборный конус на 30 В, смещение от источника на 30 В, температура источника составляла 80°C, температура десольвации составляла 175°C, скорость газа в конусе составляла 50 л/ч, скорость газа при десольвации составляла 600 л/ч и давление газа в небулайзере составляло 6,5 бар. Масс-спектры получали по диапазону m/z 50-1700. Точность масс-спектрометрии поддерживали в каждом прогоне путем одновременной инфузии 100 фмоль/мкл [Glu1]-фибринопептида В человека через зонд с фиксированной массой.

MSE-идентификацию недейттерированных получаемых под воздействием пепсина пептидов выполняли с использованием программного обеспечения ProteinLynx Global Server (Waters Corp.). Поглощение дейтерия для каждого пептида определяли с применением программного обеспечения DynamX 2.0 (Waters Corp.). Относительные уровни дейтерия вычисляли путем вычитания центра тяжести изотопного распределения для недейттерированных пептидов из соответствующего центра тяжести меченного дейтерием пептида. Графики поглощения дейтерия создавали автоматически с помощью программного обеспечения.

Отслеживание поглощения дейтерия для состояний PAI-1

После расщепления пепсина в режиме реального времени идентифицировали 150 получаемых под воздействием пепсина пептидов, перекрывающихся с PAI-1 макака-крабоведа, что приводило к 95,3% охвату последовательности (см. фигуру 48). Поглощение дейтерия отслеживали (от 10 с до 4 часов) во всех 150 пептидах для трех разных состояний белка: (1) PAI-1 макака-крабоведа отдельно; (2) A44v11, связанный с PAI-1 макака-крабоведа; и (3) APGv2, связанный с PAI-1 макака-крабоведа.

Большинство пептидов PAI-1 макака-крабоведа демонстрировали практически идентичное поглощение дейтерия среди этих трех состояний, что указывает на отсутствие взаимодействия между PAI-1 макака-крабоведа и какого-либо mAb в данных областях. См. фигуру 49(A), на которой изображена одна иллюстративная область пептида с данным результатом (остатки 139-152). Наоборот, пептиды, включающие остатки 44-64, демонстрировали значительную защищенность от обмена (пониженное поглощение дейтерия) во время связывания либо с A44v11, либо с APGv2 (фигура 49(B)). В дополнение, пептиды, включающие остатки 295-322, также демонстрировали значительную защищенность от обмена при связывании либо с A44v11, либо с APGv2 (фигура 49(C)). Для данной области величина защищенности была большей при связывании PAI-1 макака-крабоведа с A44v11, а не с APGv2 (см. фигуру 49(C)). Это указывает на то, что A44v11 может обеспечивать более значительную общую защищенность от обмена, чем APGv2 при связывании с PAI-1 макака-крабоведа.

Сравнительные анализы

Для сравнительных анализов поглощение дейтерия отслеживали для всех из 150 пептидов, полученных из каждого из трех состояний PAI-1 макака-крабоведа. (См., в целом, Wei, et al., *Drug Discovery Today*, 19(1): 95-102 (2014)). Графики данных для каждого из трех состояний сравнивали между собой и диаграмму "бабочек" строили для облегчения интерпретации данных (см., например, фигуры 50(A), 51(A) и 52(A)). Для каждой диаграммы "бабочек" ось x представляет собой рассчитанное положение средней точки пептида, i , для каждого из 150 сравниваемых

пептидов; ось у представляет собой средний относительный частичный обмен (соотношение).

Для каждого сравнения между состояниями PAI-1 макака-крабоеда (см., например, фигуры 50(B), 51(B), и 52(B)) также создавали разные графики. В данных графиках поглощение дейтерия для одного состояния вычисляли из другого и откладывали на графике подобно диаграммам "бабочек". Сумму различий для каждого пептида представляли с помощью вертикальной черты. Горизонтальные пунктирные линии представляют значения при которых каждое любое отдельное измерение ($\pm 0,5$ Да) или сумма различий ($\pm 1,1$ Да) превышает ошибку измерений и может рассматриваться в качестве реальных различий между двумя состояниями. Дополнительные детали, касающиеся данной технологии, раскрыты в Houde D. et al., *J. Pharm. Sci.* 100(6):2071-86 (2011).

Прежде всего, PAI-1 макака-крабоеда в отдельности сравнивали со связанным состоянием A44v11:PAI-1 макака-крабоеда (фигура 50). Диаграмма "бабочек" для данного сравнения показана на фигуре 50(A). График различий для данного сравнения показан на фигуре 50(B). Наблюдаемые различия между PAI-1 макака-крабоеда, связанного с A44v11, и свободной формой PAI-1 макака-крабоеда расположены, в основном, в двух областях PAI-1 макака-крабоеда. Одна область находится вблизи N-конца (остатки 44-64), а другая область находится вблизи C-конца (остатки 307-321) (см. фигуру 50(B)).

Затем PAI-1 макака-крабоеда в отдельности сравнивали со связанным состоянием APGv2:PAI-1 макака-крабоеда (фигура 51). Диаграмма "бабочек" для данного сравнения показана на фигуре 51(A). График различий для данного сравнения показан на фигуре 51(B). Наблюдаемые различия между PAI-1 макака-крабоеда, связанного с APGv2, и свободной формой PAI-1 макака-крабоеда расположены, в основном, в двух областях PAI-1 макака-крабоеда. Одна область расположена вблизи N-конца, а другая - вблизи C-конца, подобно результату A44v11:PAI-1 макака-крабоеда. Комплексы A44v11 и APGv2 с PAI-1 макака-крабоеда имеют общие

пептиды, демонстрирующие пониженное поглощение дейтерия в связанном состоянии, что может указывать на то, что эпитопы для этих двух антител являются подобными.

Наконец, два состояния связанности с антителом PAI-1 макака-крабоеда сравнивали с каждым другим (фигура 52). Диаграмма "бабочек" для данного сравнения показана на фигуре 52(A). График различий для данного сравнения показан на фигуре 52(B). Наблюдаемое различие между A44v11:PAI-1 макака-крабоеда и APGv2:PAI-1 макака-крабоеда расположено в С-концевой области PAI-1 макака-крабоеда. (См. фигуру 52(B)).

Пример 25: Сравнение эпитопов для антител A44v11 и APGv2

HDX MS применяли для дополнительного определения эпитопов для антител A44v11 и APGv2. Посредством использования перекрывающихся пептидов, полученных в HDX MS, эпитоп для антитела можно уточнить слегка лучше, чем при разрешении на пептидном уровне (например, см. фигуру 48). Данные HDX MS для пептидов, которые демонстрировали значительную защищенность от обмена со связыванием A44V11, анализировали дополнительно для определения эпитопа при взаимодействии PAI-1 макака-крабоеда:A44v11. Обнаружили, что данные HDX для эпитопа PAI-1 макака-крабоеда для A44V11, соответствовали эпитопу, определенному с использованием кристаллографического подхода. Эпитоп PAI-1 макака-крабоеда для A44V11, идентифицированный с использованием HDX MS, показан на фигуре 53 (жирный шрифт) и ниже в сокращенной форме:

T-T-G-G-E-T-R-Q-Q-I-Q (SEQ ID NO:159);

R-H-L (SEQ ID NO:160);

T-D-M-X-X-X-F-Q-A-D-F-T-S-L-S-N-Q-E-P-L-H-V (SEQ ID NO:161)

Данные HDX MS для пептидов PAI-1 макака-крабоеда, которые демонстрировали значительную защищенность от обмена со связыванием APGv2, анализировали для дополнительного определения эпитопа при взаимодействии PAI-1 макака-крабоеда:APGv2. Данные HDX MS по картированию эпитопов для A44v11 и APGv2 показали, что эпитопы находятся в одной и той же области, как, в целом, видно на фигуре 52. В области остатков 307-321 одинаковые пептиды показывают защищенность в связанном с антителом состоянии в

случае как A44v11, так и APGv2. Однако величина защищенности была большей при связывании PAI-1 макака-крабоеда с A44v11, а не с APGv2 (см. фигуру 49(C)). Этот результат является более очевидным на фигуре 52(B), на которой изображены пики различий в области остатков 307-321 PAI-1 макака-крабоеда. Это указывает на существование различий в специфических контактах, осуществляемых между PAI-1 макака-крабоеда и каждым из антител A44V11 и APGv2. Следовательно, можно сделать вывод, что поскольку эпитопы как A44V11, так и APGv2 расположены в аналогичной области PAI-1, эпитопы для каждого антитела не являются одинаковыми.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Санофи

<120> АНТИТЕЛА К ИНГИБИТОРУ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА 1 (РАІ-1) И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 13-596-WO

<140> РСТ/US2014/050896

<141> 2014-08-13

<160> 170

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 379

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala His Leu Ala Ser Asp Phe Gly
1 5 10 15

Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val
20 25 30

Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser Val Leu Ala Met Leu Gln Leu
35 40 45

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Gln Gln Gln Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe
50 55 60

Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asp Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala
85 90 95

Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu Val Gln Gly Phe Met Pro His
100 105 110

Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu
115 120 125

Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn Asp Trp Val Lys Thr His Thr
130 135 140

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

Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80

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

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

Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
115 120

<210> 3
<211> 115
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA105 VL

<400> 3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Leu
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Gly Ala Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp

85

90

95

Arg His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp
 115

<210> 4
 <211> 125
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> mA39 VH

<400> 4

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

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

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

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

Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

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

Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

<210> 5
 <211> 110
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> mA39 VL

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr His Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr His Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val	35	40	45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Asn Ile Lys Ser Leu Gln Pro	65	70	75
Glu Asp Phe Gly Thr Phe Tyr Cys Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp	100	105	110

<210> 6
 <211> 125
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> mA44 VH

<400> 6

Glu Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln	1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly	20	25	30	
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met	35	40	45	
Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	50	55	60	
Gly Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu	65	70	75	80
Gln Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala	85	90	95	
Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	100	105	110	

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

<210> 7
<211> 110
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA44 VL

<400> 7

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 8
<211> 124
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA71 VH

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 115

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA71 VL

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp
85 90 95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp
115

<210> 10

<211> 140
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB109 VH

<400> 10

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile Gly
50 55 60

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
65 70 75 80

Asp Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Ala Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
85 90 95

Glu Val Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
100 105 110

Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
130 135 140

<210> 11
<211> 110
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB109 VL

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 12

<211> 125

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mB28 VH

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 110

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mB28 VL

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 121

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mC45 VH

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mC45 VL

<400> 15

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg
85 90 95

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

<210> 16
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 VH

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Ser Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 VL

<400> 17

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 18
 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> mE21 VH

<400> 18

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Ala Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> mE21 VL

<400> 19

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35

40

45

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

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

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

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

<210> 20

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA105 HCDR3

<400> 20

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 21

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA105 HCDR2

<400> 21

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 22

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA105 HCDR1

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Trp
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA105 LCDR3

<400> 23

Trp Gln Asp Arg His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 24

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA105 LCDR2

<400> 24

Leu Val Ser
1

<210> 25

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA105 LCDR1

<400> 25

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA39 HCDR3

<400> 26

Ala Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA39 HCDR2

<400> 27

Ile Leu Pro Gly Ser Asn Thr

1

5

<210> 28
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA39 HCDR1

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Asn Ile Tyr Trp
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA39 LCDR3

<400> 29

Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 30
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA39 LCDR2

<400> 30

Asn Ala Lys
1

<210> 31
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA38 LCDR1

<400> 31

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA44 HCDR3

<400> 32

Ala Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA44 HCDR2

<400> 33

Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA44 HCDR1

<400> 34

Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA44 LCDR3

<400> 35

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 36
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA44 LCDR2

<400> 36

Arg Ala Asn
1

<210> 37
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA44 LCDR1

<400> 37

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 38
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA71 HCDR3

<400> 38

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asn Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA71 HCDR2

<400> 39

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA71 HCDR1

<400> 40

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA71 LCDR3

<400> 41

Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 42

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA71 LCDR2

<400> 42

Leu Val Ser
1

<210> 43

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA71 LCDR1

<400> 43

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA75 HCDR3

<400> 44

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA75 HCDR2

<400> 45

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 46

<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA75 HCDR1

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA75 LCDR3

<400> 47

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Gln Thr
1 5

<210> 48
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA75 LCDR2

<400> 48

Leu Val Cys
1

<210> 49
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA75 LCDR1

<400> 49

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB109 HCDR3

<400> 50

Thr Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB109 HCDR2

<400> 51

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB109 HCDR1

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB109 LCDR3

<400> 53

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 54
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB109 LCDR2

<400> 54

Ser Ala Ser
1

<210> 55
<211> 6
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mB109 LCDR1

<400> 55

Gln Asp Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 56

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mB28 HCDR3

<400> 56

Ala Arg Leu Ser Thr Gly Thr Arg Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mB28 HCDR2

<400> 57

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Ala
1 5

<210> 58

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mB28 HCDR1

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Ser Trp
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mB28 LCDR3

<400> 59

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr

1

5

<210> 60
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB28 LCDR2

<400> 60

Asn Ala Lys
1

<210> 61
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mB28 LCDR1

<400> 61

Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 62
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mC45 HCDR3

<400> 62

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 63
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mC45 HCDR2

<400> 63

Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mC45 HCDR1

<400> 64

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mC45 LCDR3

<400> 65

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 66
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mC45 LCDR2

<400> 66

Arg Ala Asn
1

<210> 67
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mC45 LCDR1

<400> 67

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 68
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 HCDR3

<400> 68

Ala Arg Gly Leu Arg His Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 HCDR2

<400> 69

Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 HCDR1

<400> 70

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 LCDR3

<400> 71

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 72
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 LCDR2

<400> 72

Ser Ala Ser
1

<210> 73
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE16 LCDR1

<400> 73

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 74

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mE21 HCDR3

<400> 74

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 75

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mE21 HCDR2

<400> 75

Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 76

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mE21 HCDR1

<400> 76

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mE21 LCDR3

<400> 77

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 78

<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE21 LCDR2

<400> 78

Tyr Thr Ser
1

<210> 79
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mE21 LCDR1

<400> 79

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 80
<211> 124
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA75 VH

<400> 80

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro
115 120

<210> 81
<211> 114
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mA75 VL

<400> 81

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

Gln Pro Ala Ser Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu
20 25 30

Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Cys Lys Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Arg Val Glu Gly Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Ser
85 90 95

His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala Asp

<210> 82
<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HC1a

<400> 82

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Gly Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 83

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC1b

<400> 83

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Gly Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 84
<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HC2a

<400> 84

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Gly Arg Ile Ser Ile Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HC2b

<400> 85

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met

35

40

45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Gly Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 86

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC3

<400> 86

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 87
<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HC4

<400> 87

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Gly Arg Ile Thr Ile Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HC5a

<400> 88

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HC5b

<400> 89

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 90

<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HC5c

<400> 90

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC1a

<400> 91

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Ser Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 92

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC1b

<400> 92

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 93

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC2

<400> 93

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1		5		10		15											
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile		
		35					40					45					
Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Pro		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 94
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC3

<400> 94

Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile		
		35					40					45					
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Ser	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Leu	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Pro		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 95
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC4

<400> 95

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 96
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC5a

<400> 96

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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 97

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC5b

<400> 97

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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 98

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LC5c

<400> 98

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

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

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

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

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

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

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

<210> 99

<211> 255

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CH

<400> 99

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115					120					125					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
				245					250					255	
<210>	100														
<211>	107														
<212>	БЕЛОК														
<213>	Искусственная последовательность														
<220>															
<223>	CL														
<400>	100														
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
1				5					10					15	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
		35					40					45			
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
	50					55					60				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
65					70					75					80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 101
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> vk1

<400> 101

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

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

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

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

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

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

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

<210> 102
<211> 106
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> v-лямбда-3

<220>
<221> другой_признак
<222> (22) .. (22)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<220>
<221> другой_признак
<222> (87) .. (87)

<223> Xaa может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 102

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

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Xaa	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
			20					25					30		

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

Gln	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				

Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met
65					70					75					80

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Xaa	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Ser	Ala	Val	Val
				85					90					95	

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu
			100					105	

<210> 103

<211> 120

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> vh2

<400> 103

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

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		

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

Trp	Leu	Ala	Arg	Ile	Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ser
	50					55					60				

Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75					80

Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85					90					95	

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> vh4

<220>
<221> другой_признак
<222> (22) .. (22)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<220>
<221> другой_признак
<222> (95) .. (95)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 104

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

Thr Leu Ser Leu Thr Xaa Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Xaa Ala
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105

<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3'-праймер для тяжелой цепи

<400> 105
tatgcaaggc ttacaассас а 21

<210> 106
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3'-праймер для легкой цепи

<400> 106
ctcattcctg ttgaagctct tgag 24

<210> 107
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGKV1-33-01_IGKJ4-01

<400> 107

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

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

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

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

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

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

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

<210> 108
<211> 119
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02

<400> 108

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109

<211> 226

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> A44-hv1LC1a x HC1a

<400> 109

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 110
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv2LC1b x HC1b

<400> 110

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

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

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

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Ile Lys Glu Met Gln Leu Gln
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 111
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv3LC2 x HC2a

<400> 111

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 112
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv4LC1a x HC2b

<400> 112

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 113

<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv5LC2 x HC2b

<400> 113

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 114
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv6LC3 x HC3

<400> 114

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly

195

200

205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 210 215 220

Ser Ser
 225

<210> 115
 <211> 226
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> A44-hv7LC4 x HC4

<400> 115

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
 100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
 130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
 165 170 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 116
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv8LC5a x HC5a

<400> 116

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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr

145						150						155						160
Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile			
				165					170					175				
Ser	Arg	Asn	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val			
				180					185					190				
Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	His	Tyr	Gly			
				195					200					205				
Ser	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val			
				210					215					220				
Ser	Ser																	
225																		
<210>	117																	
<211>	226																	
<212>	БЕЛОК																	
<213>	Искусственная последовательность																	
<220>																		
<223>	A44-hv9LC5b x HC5b																	
<400>	117																	
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	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr			
				20					25					30				
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile			
				35					40					45				
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Ser	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly			
				50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
65					70					75					80			
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Pro			
				85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gln	Met	Gln	Leu	Gln			
				100					105					110				
Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr			
				115					120					125				

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 118
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv10LC5c x HC5c

<400> 118

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln

100				105				110							
Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr
		115					120					125			
Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Met	Thr	Asn	Gly	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile
		130					135					140			
Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Tyr	Met	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr
145					150					155					
Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Val	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile
				165					170					175	
Asn	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Tyr	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Val
				180					185					190	
Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	His	Tyr	Gly
		195					200					205			
Ser	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
		210					215					220			
Ser	Ser														
225															
<210>	119														
<211>	226														
<212>	БЕЛОК														
<213>	Искусственная последовательность														
<220>															
<223>	A44-hv11LC2 x HC3														
<400>	119														
Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1					5					10					15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
				20					25					30	
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 120
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv12LC4 X HC3

<400> 120

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 121
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv13LC2 x HC5b

<400> 121

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
100 105 110

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

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 122
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A44-hv14LC4 x HC5b

<400> 122

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

<220>
 <223> HC1a

<400> 123
 gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60
 acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120
 cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180
 cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240
 accctgtcca gcgtg 255

<210> 124
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC1b

<400> 124
 gagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60
 acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120
 cccggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180
 cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240
 aagctgtcca gcgtg 255

<210> 125
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC2a

<400> 125
 gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60
 acctgcagcg tgaccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc 120
 cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180
 cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg 240
 accctgtcca gcgtg 255

<210> 126
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC2b

<400> 126

gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctgggtcaaac ccacccagac cctgagcctg	60
acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc	120
cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg	240
accctgtcca gcgtg	255

<210> 127
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> НС3

<400> 127	
cagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctgggtcaaac ccacccagac cctgagcctg	60
acctgcagcg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagttc	120
cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agggccggat caccatcacc cgggacacca gcaagaacca gtactacctg	240
accctgagca gcgtg	255

<210> 128
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> НС4

<400> 128	
cagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctgggtcaaac ccacccagac cctgagcctg	60
acctgcagcg tgtccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggcagttc	120
cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agggccggat caccatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg	240
accctgagca gcgtg	255

<210> 129
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> НС5a

<400> 129	
caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctgggtcaaac ccagcgagac actgagcctg	60
acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc	120

cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agtcccggat caccatcagc cggaacacca gcaagaacca gtacagcctg	240
aagctgagca gcgtg	255

<210> 130
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC5b

<400> 130	
cagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctgggtcaaac ccagcgagac actgagcctg	60
acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc	120
cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agtcccggat caccatcagc cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg	240
aagctgagca gcgtg	255

<210> 131
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HC5c

<400> 131	
cagatgcagc tgcagcagag cggccctggc ctgggtcaaac ccagccagac cctgagcctg	60
acctgcgcca tcagcggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagagc	120
cccagcagag gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacgcc	180
gtgtccgtga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg	240
cagctgagca gcgtg	255

<210> 132
 <211> 255
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC1a

<400> 132	
gacatcaaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaaaccga gcgtggacgg cgtgccaaagc	180
agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc	240

gaggacctgg gcatc 255

<210> 133
<211> 255
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC1b

<400> 133
gacatcaaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgtgt ctctggcca gaccgtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120
ggcagtgccc ccaagaccct gatctaccgg gccaacgcga gcgtggacgg cgtgccaaagc 180
agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcaggcc 240
atggacgagg gcatc 255

<210> 134
<211> 255
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC2

<400> 134
gacatcaaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120
ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccagcggga gcgtggaagg cgtgccaaagc 180
agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacctgg gcatc 255

<210> 135
<211> 255
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC3

<400> 135
gacatcaaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120
ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaacgcga gcgtggacgg cgtgccaaagc 180
agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacctgg ccacc 255

<210> 136

<211> 255
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC4

<400> 136
gacatcaaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120
ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccagcggga gcgtggaagg cgtgccaaagc 180
agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacctgg ccacc 255

<210> 137
<211> 255
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC5a

<400> 137
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaaagc 180
agattttccg gcagcggctc cggcacccgac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacc 255

<210> 138
<211> 255
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> LC5b

<400> 138
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaaagc 180
agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacc 255

<210> 139
<211> 255
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> LC5c

<400> 139
 gagatcgtga tgacccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
 ctgagctgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120
 ggccaggccc ccagaaccct gatctaccgg gccaacagaa gcgtggacgg catccccgcc 180
 agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240
 gaggacttcg ccgtg 255

<210> 140
 <211> 119
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> mA44 VH

<400> 140

Glu	Met	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Ser	Met	Thr	Asn	Gly
			20					25					30		
Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Lys	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Tyr	Met
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asn	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Trp	His	Tyr	Gly	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser									

<210> 141
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> mA44 VL

<400> 141

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 142

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mA44 VL

<400> 142

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe
115

<210> 143
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGKV3-11-02_IGKJ4-0

<400> 143

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

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

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

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

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

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

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

<210> 144
<211> 123
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02

<400> 144

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

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

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

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 145
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 145

Arg Ala Gln
1

<210> 146
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 146

Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr
1 5

<210> 147
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 147

Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr

1

5

<210> 148
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 148

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

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Lys Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 149
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 149

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu His Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe
85 90 95

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

<210> 150

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 150

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

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

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

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

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

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

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

<210> 151

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<220>
<221> другой_признак
<222> (99)..(103)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 151

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 152
<211> 118
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<220>
<221> другой_признак
<222> (99)..(103)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 152

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 153
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 153

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

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

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

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

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

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

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

<210> 154

<211> 117
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 154

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 155
<211> 117
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 155

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

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

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

Gly Ile Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 156
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<220>
<221> другой_признак
<222> (2) .. (3)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 156

Glu Хаа Хаа Gln
1

<210> 157
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<220>
<221> другой_признак
<222> (2) .. (2)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 157

Leu Хаа Arg
1

<210> 158
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<220>
 <221> другой_признак
 <222> (3) .. (4)
 <223> Xaa может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<220>
 <221> другой_признак
 <222> (13) .. (14)
 <223> Xaa может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 158

Thr	Asp	Xaa	Xaa	Arg	Gln	Phe	Gln	Ala	Asp	Phe	Thr	Xaa	Xaa	Ser	Asp
1				5					10					15	

Gln Glu Pro Leu
 20

<210> 159
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственная последовательность

<400> 159

Thr	Thr	Gly	Gly	Glu	Thr	Arg	Gln	Gln	Ile	Gln
1				5					10	

<210> 160
 <211> 3
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственная последовательность

<400> 160

Arg His Leu
 1

<210> 161
 <211> 22
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственная последовательность

<220>
 <221> другой_признак
 <222> (4) .. (6)

<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 161

Thr Asp Met Xaa Xaa Xaa Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn
1 5 10 15

Gln Glu Pro Leu His Val
20

<210> 162

<211> 402

<212> БЕЛОК

<213> яванский макак

<400> 162

Met Gln Met Ser Pro Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Phe
1 5 10 15

Val Phe Gly Glu Gly Ser Thr Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala
20 25 30

His Leu Ala Ser Asp Phe Gly Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln
35 40 45

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

Val Leu Ala Met Leu Gln Leu Thr Thr Gly Gly Glu Thr Arg Gln Gln
65 70 75 80

Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro
85 90 95

Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys Glu Leu Leu Gly Pro Trp Asn Lys Asp
100 105 110

Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu
115 120 125

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val
130 135 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Ala Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145 150 155 160

Asp Trp Val Lys Thr His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Gly
165 170 175

Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu

180

185

190

Tyr Phe Asn Gly His Trp Lys Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His
195 200 205

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

Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225 230 235 240

Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Asn Thr Leu
245 250 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Tyr Glu Lys Gln Val Pro Leu Ser Ala
260 265 270

Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn
275 280 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
290 295 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys Pro Leu Glu Asn Leu Gly Met Thr Asp
305 310 315 320

Met Phe Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn Gln Glu
325 330 335

Pro Leu His Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala
355 360 365

Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 163
<211> 402
<212> BEJOK
<213> Mus musculus

<400> 163

Met Gln Met Ser Ser Ala Leu Ala Cys Leu Ile Leu Gly Leu Val Leu
1 5 10 15

Val Ser Gly Lys Gly Phe Thr Leu Pro Leu Arg Glu Ser His Thr Ala
20 25 30

His Gln Ala Thr Asp Phe Gly Val Lys Val Phe Gln Gln Val Val Gln
35 40 45

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

Val Leu Ala Met Leu Gln Met Thr Thr Ala Gly Lys Thr Arg Arg Gln
65 70 75 80

Ile Gln Asp Ala Met Gly Phe Lys Val Asn Glu Lys Gly Thr Ala His
85 90 95

Ala Leu Arg Gln Leu Ser Lys Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asn
100 105 110

Glu Ile Ser Thr Ala Asp Ala Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Glu Leu
115 120 125

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Lys Leu Phe Gln Thr Met Val
130 135 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145 150 155 160

Asp Trp Val Glu Arg His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Ala
165 170 175

Lys Gly Ala Val Asp Glu Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
180 185 190

Tyr Phe Ser Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Leu Glu Ala Ser Thr His
195 200 205

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

Met Ala Gln Ser Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225 230 235 240

Gly Leu Glu Tyr Asp Val Val Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Asp Thr Leu
245 250 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Phe Glu Lys Asp Val His Leu Ser Ala
260 265 270

Leu Thr Asn Ile Leu Asp Ala Glu Leu Ile Arg Gln Trp Lys Gly Asn
275 280 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Ile Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
290 295 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Gly Pro Leu Glu Lys Leu Gly Met Pro Asp
305 310 315 320

Met Phe Ser Ala Thr Leu Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu
325 330 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Arg Ile Glu Val Asn
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Phe Val Ile Ser Ala
355 360 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Ile Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Val Met
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 164
<211> 402
<212> BEJOK
<213> Rattus norvegicus

<400> 164

Met Gln Met Ser Ser Ala Leu Thr Cys Leu Thr Leu Gly Leu Val Leu
1 5 10 15

Val Phe Gly Lys Gly Phe Ala Ser Pro Leu Pro Glu Ser His Thr Ala
20 25 30

Gln Gln Ala Thr Asn Phe Gly Val Lys Val Phe Gln His Val Val Gln
35 40 45

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

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

Ile Phe Ser Ser Thr Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu
325 330 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Ile Leu Val Ser Ala
355 360 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Leu Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Leu Met
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 165
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 165

Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 166

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 167
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 167

Arg Ala Asn

1

<210> 168
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 168

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 169

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 170
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 170

Arg Ala Asn
1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с PAI-1, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 или 89 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и

вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91, 93, 94, 95, 96 или 97 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO:145, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

2. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с PAI-1, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 или 89 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и

вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91, 93, 94, 95, 96 или 97 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO:145, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

3. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с PAI-1, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 96% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 или 89 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:34, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и

вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 96% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96 или 97 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO:145, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

4. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с PAI-1, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или 89; и

вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 96% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96 или 97 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO:145, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

5. Выделенное моноклональное антитело по п. 4, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и вариабельная область легкой цепи является по меньшей мере на 96% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 97 и содержит CDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, CDR2-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO:145, и CDR3-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

6. Применение фармацевтически эффективного количества моноклонального антитела к PAI-1 по любому из пп. 1-5 для производства лекарственного средства для восстановления образования плазмينا у субъекта, нуждающегося в этом.

7. Применение по п. 6, где лекарственное средство можно вводить перорально, парентерально с помощью раствора для

инъекций, путем ингаляции или местно.

8. Применение по п. 6, где лекарственное средство лечит состояние, включающее повышенные уровни фиброзной ткани.

9. Применение по п. 8, где состояние представляет собой фиброз, системный склероз, интерстициальное заболевание легких, хроническое заболевание легких, хроническое заболевание почек, периферическую ишемию конечностей, острый ишемический инсульт, сопровождающийся и не сопровождающийся тромболизом, или рестеноз в стенте.

10. Применение по п. 9, где лекарственное средство лечит состояние, представляющее собой фиброз кожи, фиброз легких, идиопатический легочный фиброз, фиброз печени или фиброз почек.

11. Применение по п. 9, где лекарственное средство лечит состояние, представляющее собой венозный и артериальный тромбоз, тромбоз глубоких вен или тромбоз по типу диссеминированного внутрисосудистого свертывания.

12. Контейнер, содержащий выделенное моноклональное антитело по любому из пп. 1-5.

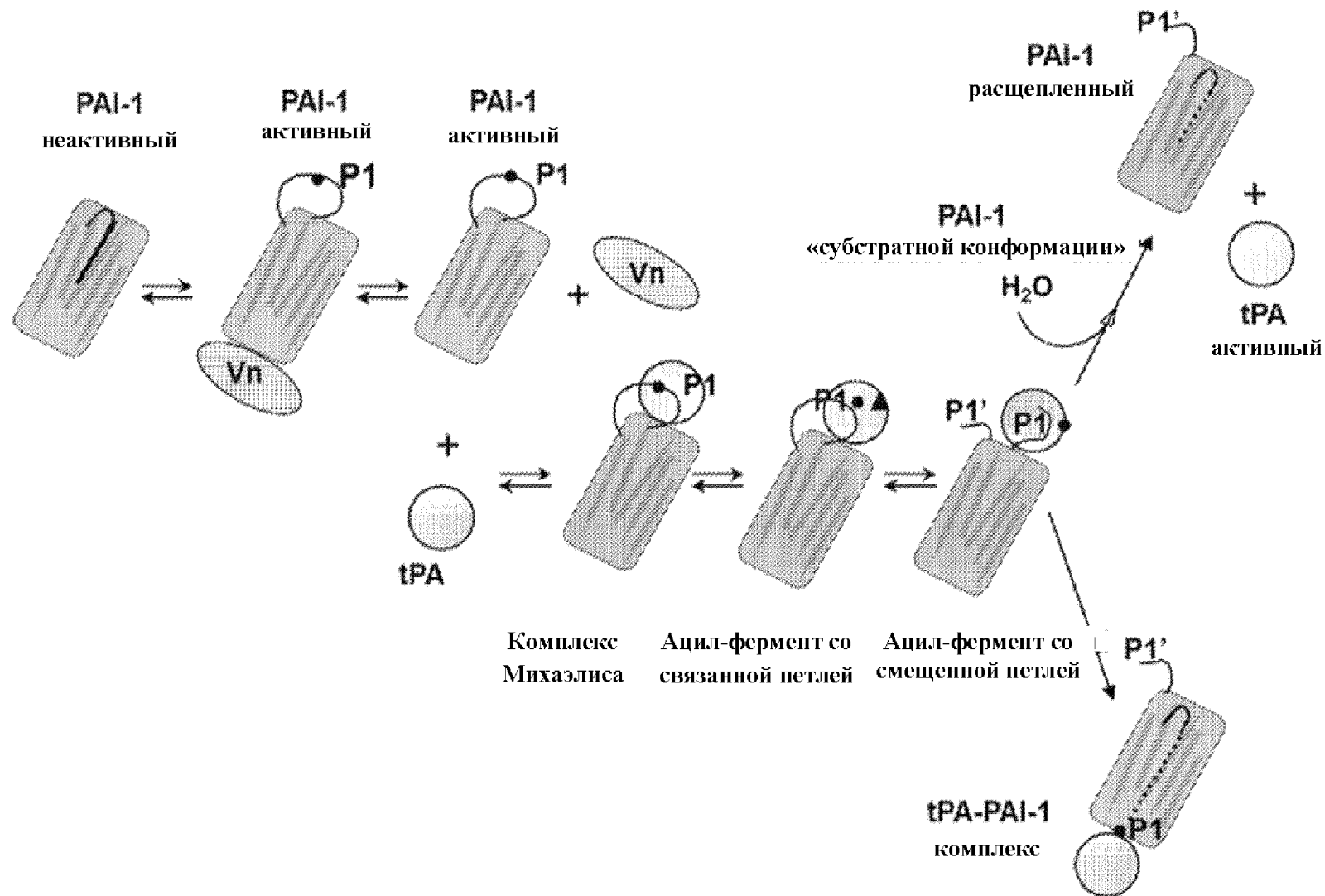
13. Контейнер по п. 12, где контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц или флакон.

14. Набор, содержащий контейнер по п. 12 или 13 и этикетку или инструкции для введения и/или применения выделенного моноклонального антитела.

15. Применение фармацевтически эффективного количества антитела к PAI-1 по любому из пп. 1-5 для производства лекарственного препарата для восстановления образования плазмينا у субъекта или лечения повышенных уровней фиброзной ткани, фиброза, системного склероза, интерстициального заболевания легких, хронического заболевания легких, хронического заболевания почек, периферической ишемии конечностей, острого ишемического инсульта, сопровождающегося и не сопровождающегося тромболизом, рестеноза в стенте, фиброза кожи, фиброза легких, идиопатического легочного фиброза, фиброза печени, фиброза почек, венозного и артериального тромбоза, тромбоза глубоких вен или тромбоза по типу диссеминированного внутрисосудистого свертывания.

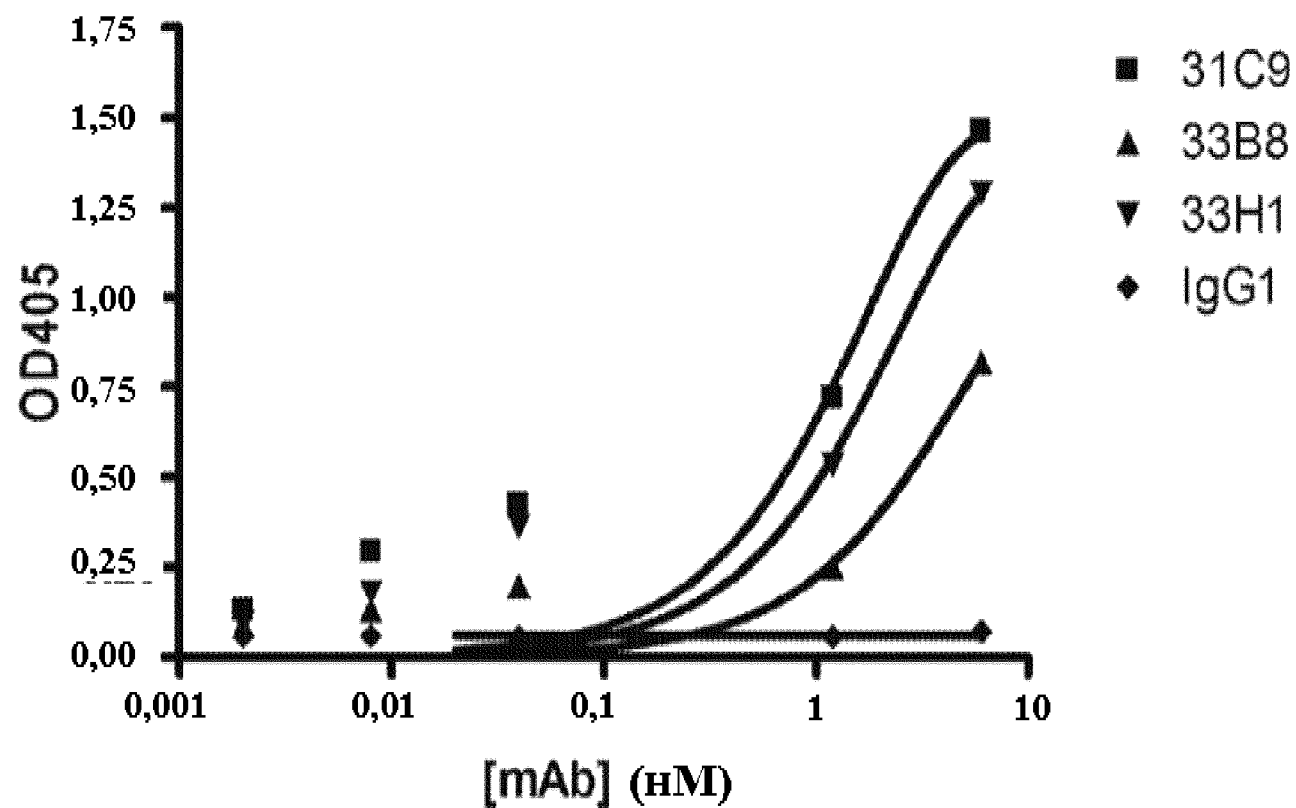
лечения состояния, вызываемого повышенными уровнями РАІ-1 или повышенной чувствительностью к РАІ-1.

По доверенности



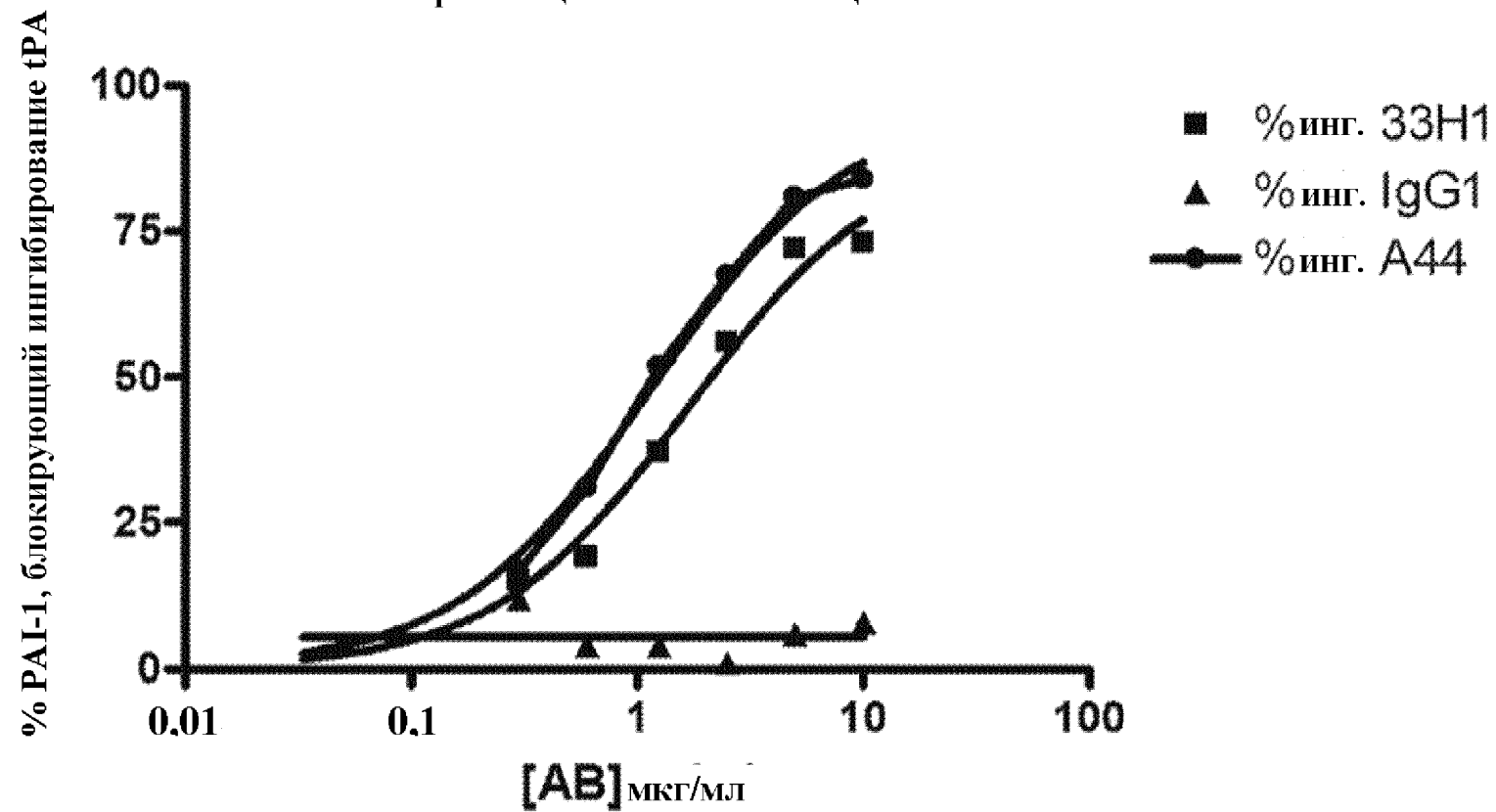
ФИГ. 1

Титрование mAb в комплексе Vn/PAI-1 (ELISA)



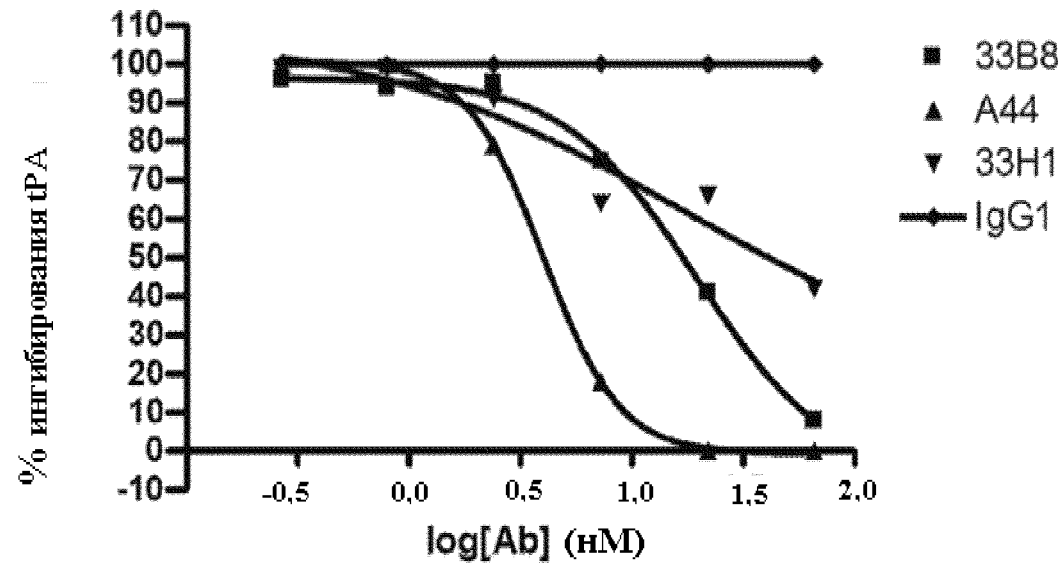
ФИГ. 2

Нейтрализация PAI-1 с помощью антител



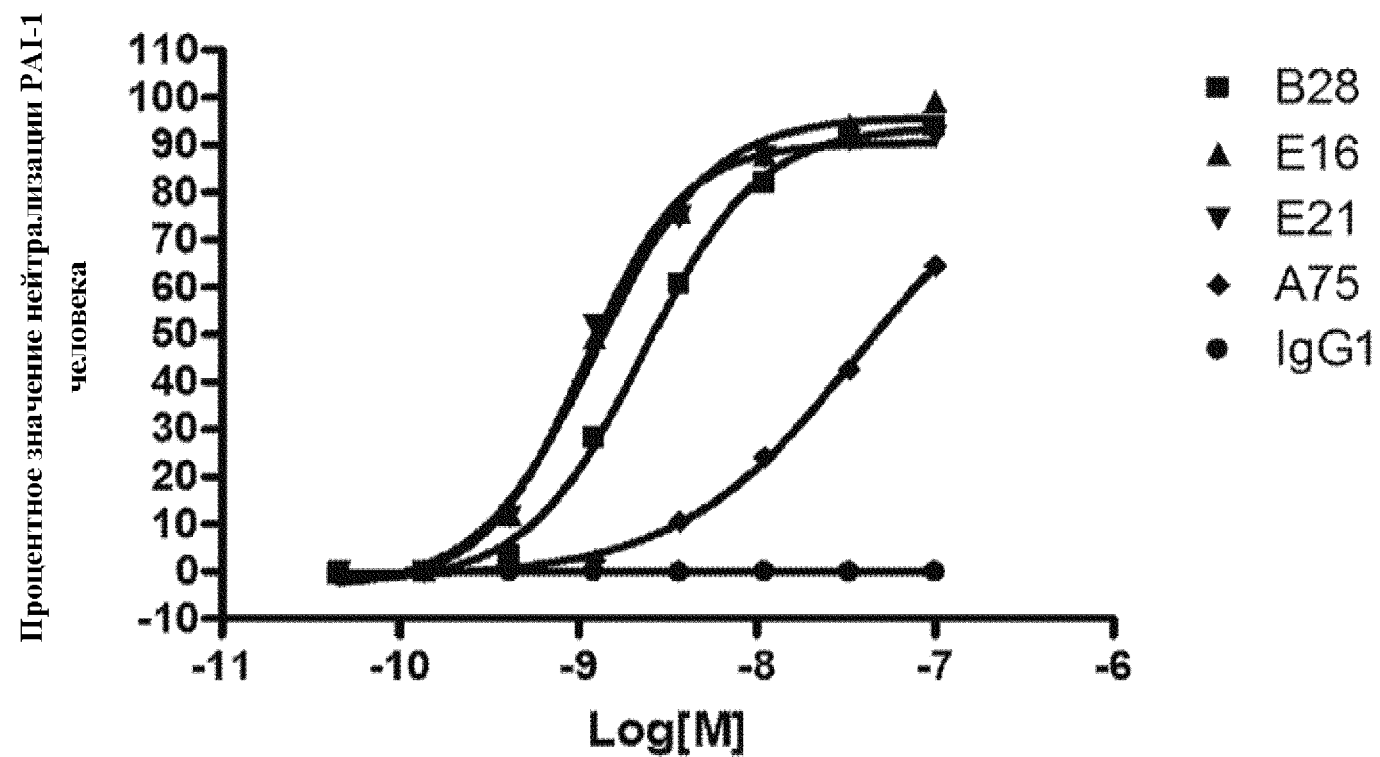
ФИГ. 3

% Ингибирования tPA с помощью инкубирования PAI-1 с mAbs



	33B8	A44	33H1
Сигмоидальная кривая доза-эффект (переменный наклон)			
Значения наилучшего приближения			
НИЖНЕЕ	-7,036	-0,6570	14,38
ВЕРХНЕЕ	96,59	100,8	108,9
LOGEC50	1,292	0,6048	1,249
КРУТИЗНА ХАРАКТЕРИСТИКИ	-1,449	-2,526	-0,5931
EC50	19,58	4,026	17,76

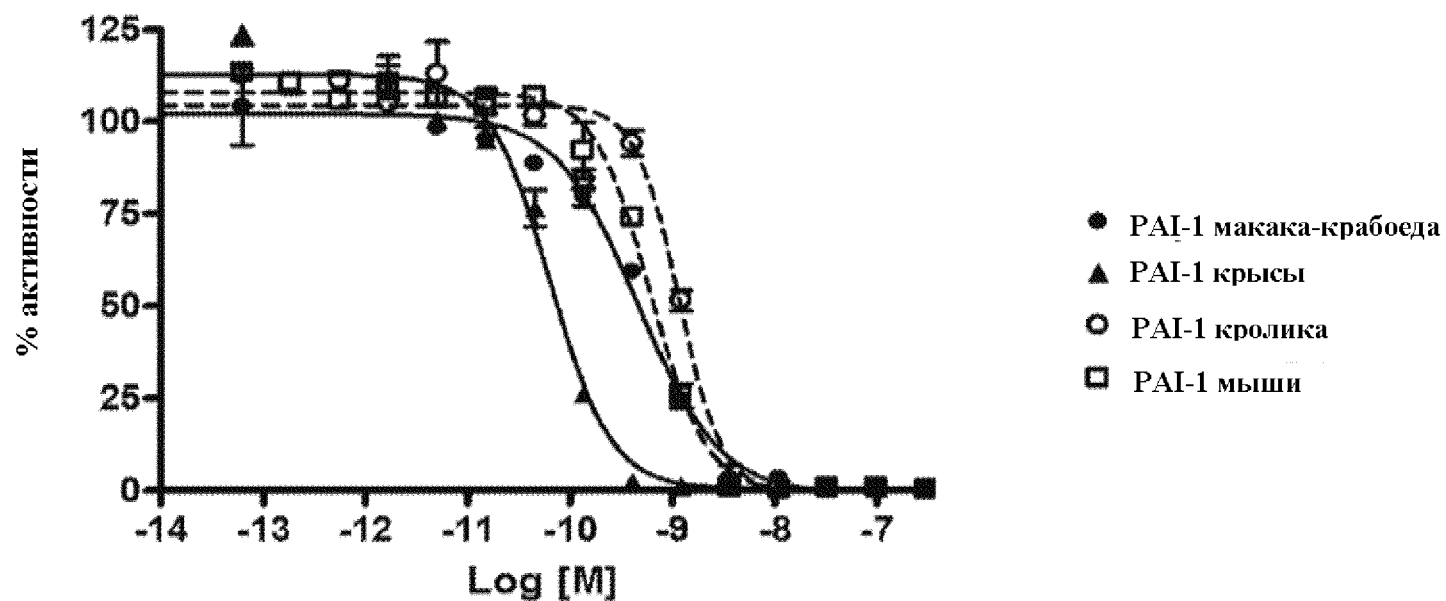
ФИГ. 4



КРУТИЗНА ХАРАКТЕРИСТИКИ EC50	B28	E16	E21	A75
	1,336 2,302e-009	1,338 1,237e-009	1,555 1,081e-009	0,8527 3,820e-008

ФИГ. 5

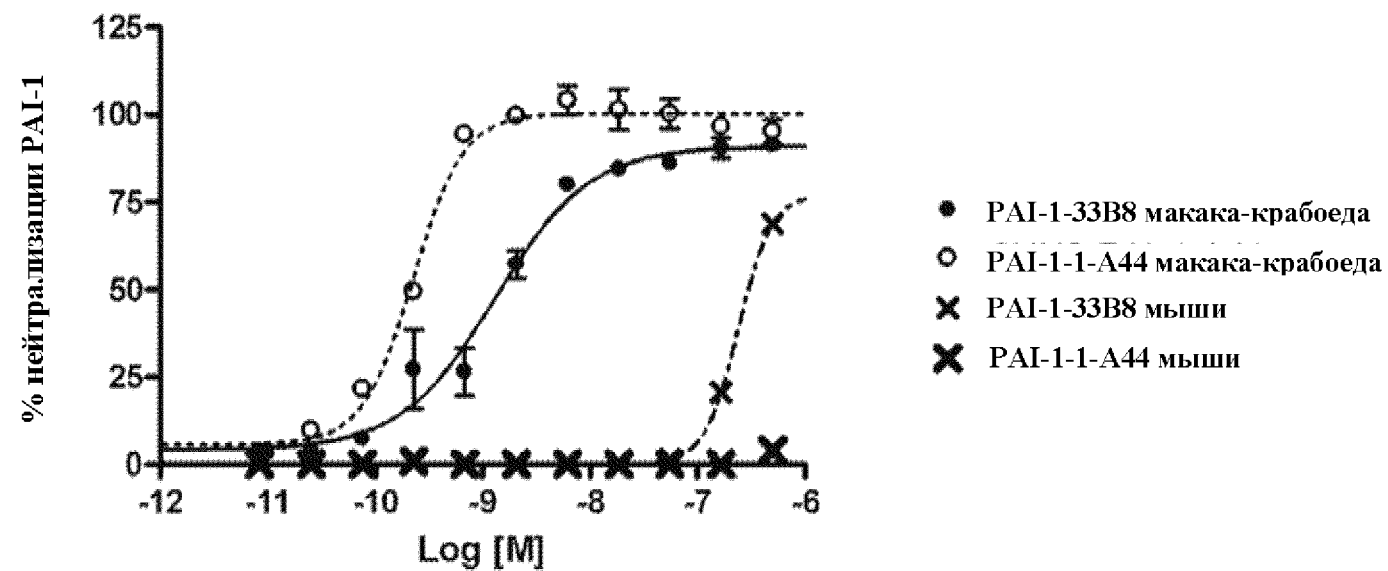
% активности 1,4 нМ tРА к PAI-1 мыши, макака-
кравоеда, крысы и кролика в отношении



	PAI-1 макака-кравоеда	PAI-1 крысы	PAI-1 кролика	PAI-1 мыши
Крутизна характеристики	-1,087	-1,461	-2,079	-1,606
EC50	4,632e-010	6,425e-011	1,169e-009	6,143e-010

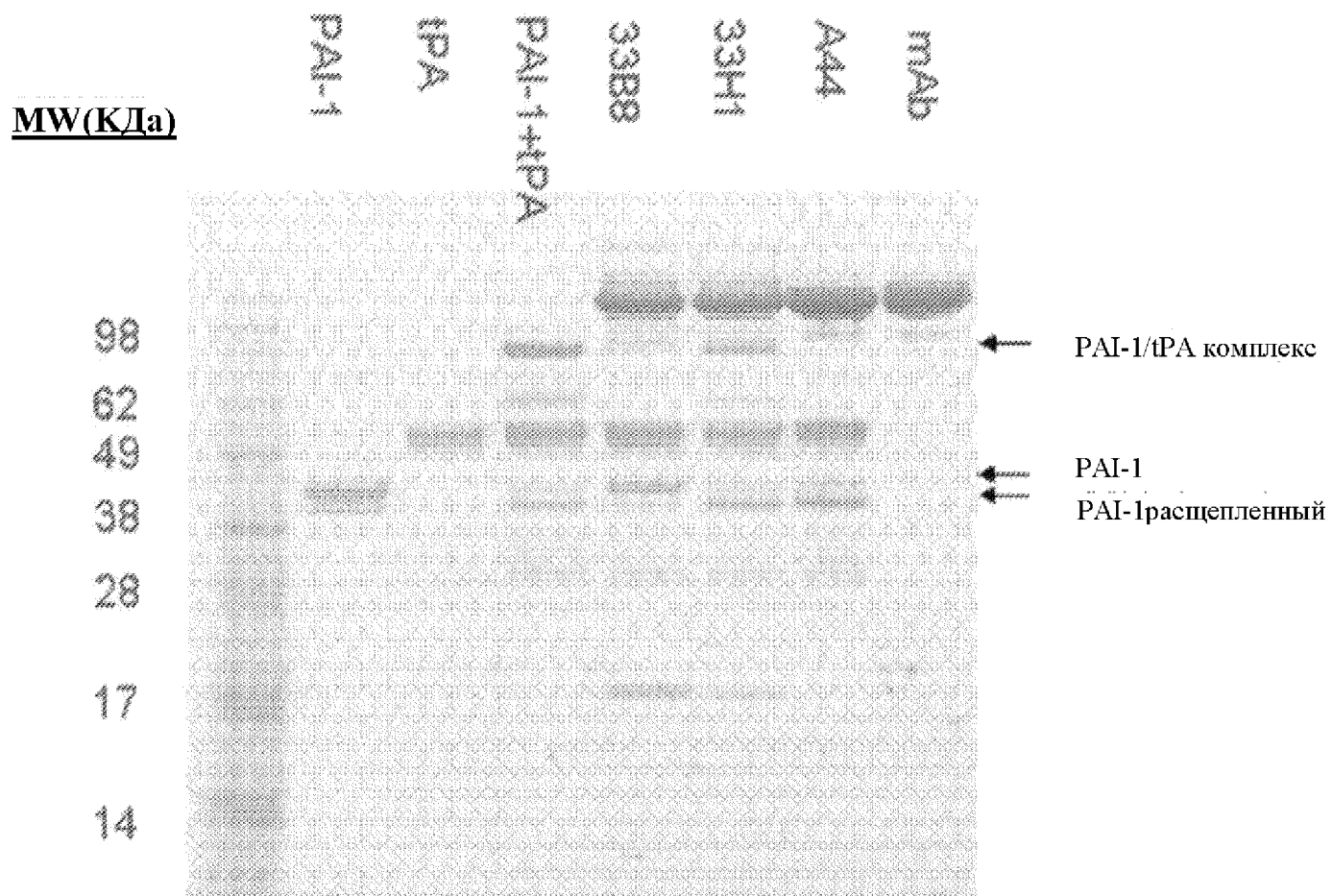
ФИГ. 6

% нейтрализации 2,8 нМ PAI-1 макака-крабоведа и 2,8 нМ PAI-1 мышши к
IMA-33B8 и A44 mab

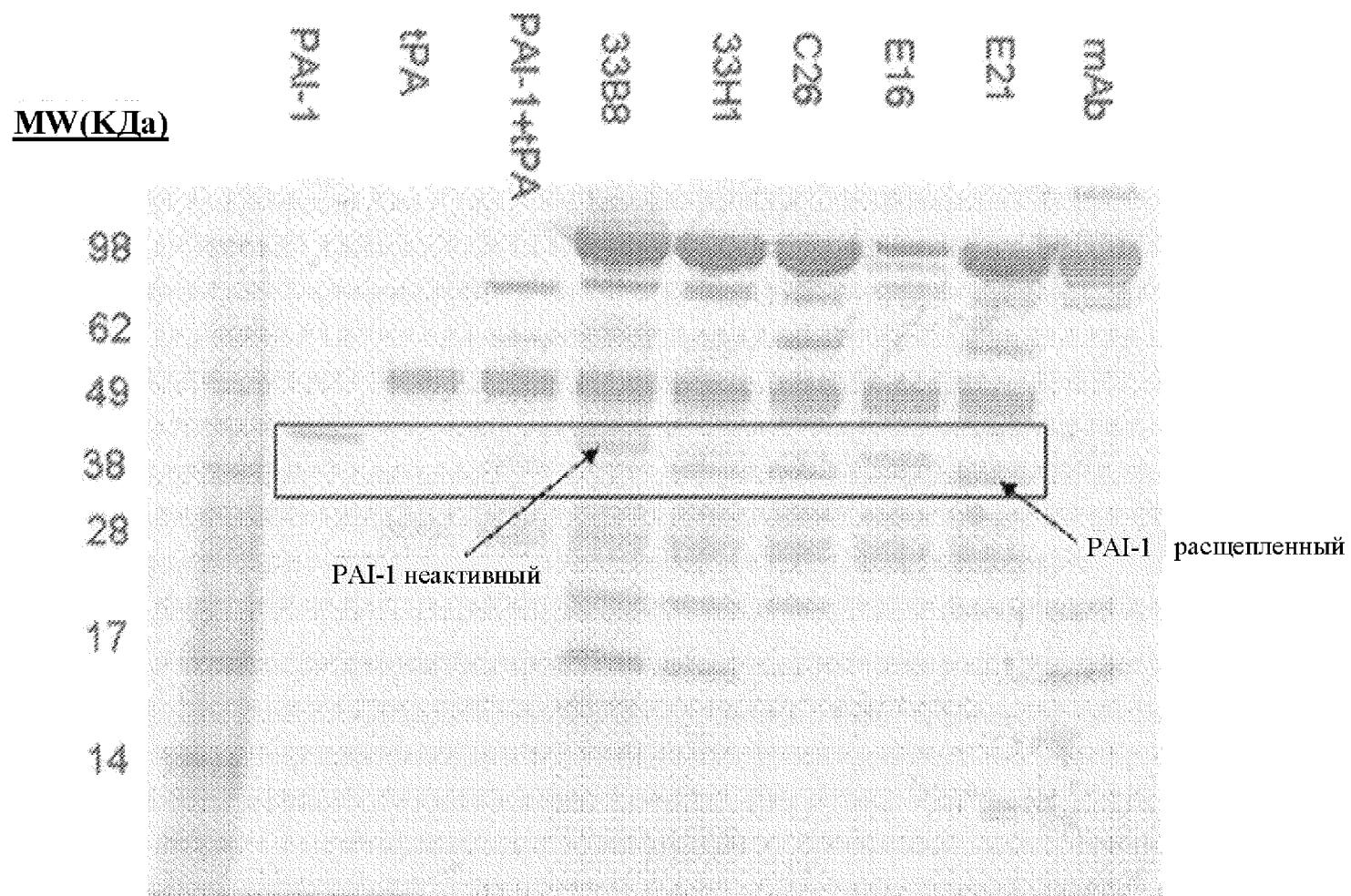


	PAI-1-33B8 макака-крабоведа	PAI-1-1-A44 макака-крабоведа	PAI-1-33B8 мышши
Кривизна характеристики	0,9877	1,841	2,831
EC50	1,303e-009	2,225e-010	2,395e-007

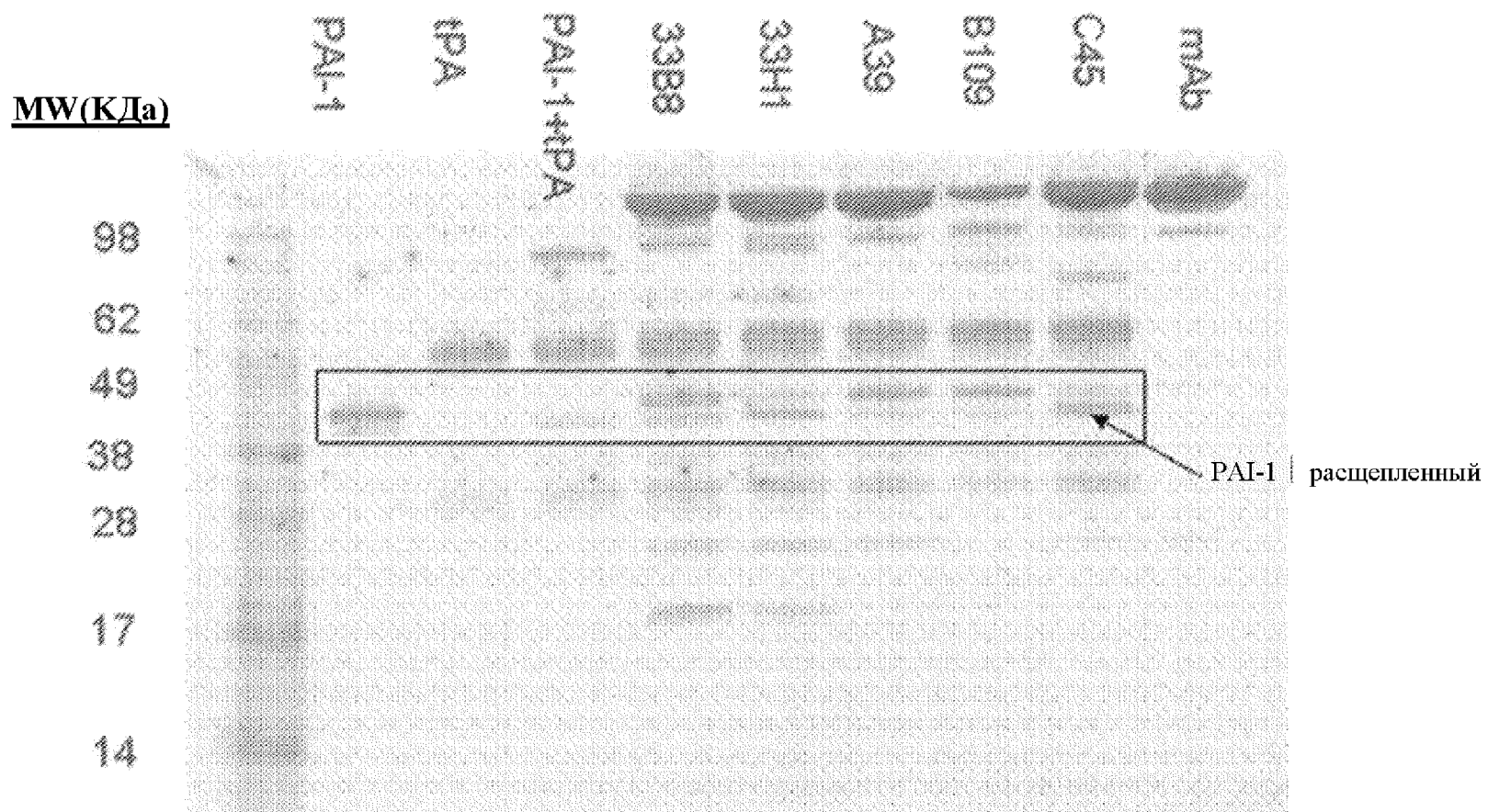
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

VL BЫPABHИBAHИE

A105: DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPQRLISLVSK
A39: DIQMTTHSPASLSASVGETVTITCRASENIY-----SYLAWYHQKQGKSPQLLVYNAKT
A44: DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWLQQKPGKSPKTLIYRANR
A71: DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLYWLLQRPQGSPKRLIYLVSK
A75: DVVMTQTPLTLSVTIGQPASI-CKSSQSLLDSEGKTYLNWLLFQRPQGSPKRLIYLVCK
B109: DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSIIPCKASQDVS-----SAVAWYQQKLGQSPKLLIYSASF
B28: DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVY-----SYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKT
C45: DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
E16: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVS-----TAVGWYQQEPQGSPKLLIYSASN
E21: DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS-----NYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR

A105: LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLRSRVEGADLGVIYCWQDRHFPRTFGGGKLEIKRAD
A39: LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNKLQPEDEFGTFYCQHRYGSPWTFGGGKLEIKRAD
A44: SVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPPTFGGGKLEIKRAD
A71: LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLRSRVEAEDLGVIYCWQDTHFPRTFGGGKLEIKRAD
A75: LDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKLRSRVEGEDLGVIYCWQGSHPPTFGGGKLEIKRAD
B109: RYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVIYCWQHYSSPYTFGGGTNLEIKRAD
B28: LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLQPEDEFGSYIYCHHYGTPPTFGGGKVEIKRAD
C45: LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRTFGGGKLEIK---
E16: RHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVIYCWQHYSSPWTFGGGKLEIK---
E21: LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIK---

VH ВЫПАВННВАННН

A105: QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSIYWIEWVKQRPGL-----GLEWIGEILPGSGST
A39: QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQWVKQRPGH-----GLEWIGEILPGSN-T
A44: EMQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSMTNGYWNWIRKFPGN-----KLEYMGYIT-YSGST
A71: QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQRPGH-----GLDWIGEILPGSGNT
A75: QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIAWLKQRPGH-----GLEWIAEILPGSGLT
B109: EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDT
B28: QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQRPGH-----GLEWIGKILPGSGGA
C45: QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWIKQRPGQ-----GLEWIGVIHPGSGVT
E16: EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQTPEK-----GLGWVASLRTGGN-T
E21: EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRPEQ-----GLEWIGWIDPENGDT

A105: NYNEKFKGKATFTADTSSNTAFMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYDLDYWGQGTTLTVSSAKTTPP
A39: NYNEKFKDKATFTADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGI-GLRGALDYWGQGTSTVTVSSAKTTPP
A44: YYNPSLKGRISITRNTSKNQYYLQLSSVTTEDTATYYCARWHY-GSPYYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP
A71: NYNEKFKGKATFTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYNLDSWGQGTTLTVSSAKTTPP
A75: NYNEIFRGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTAP
B109: TYNQKFEDKAKLTAVASASTAYMEVSSLTNEDSAVYYCTRG--LRRWGAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPP
B28: NYNEKFKGKATVTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARLST-GTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP
C45: NYNEKFKGKAITADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGTSTVTVSS-----
E16: YYSDSVKGRFTISRDNDRNIIYLQMSSTLSEDTAVYYCARG--LRHWGYFDVWGAGTTVTVSS-----
E21: EYDPKFQAKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCMYG---NYPYYFDYWGQGTTLTVSS-----

Выравнивание ЛЦ A44 с vk1:

A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
VK1: DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIG SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA
A44: ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTEFGG
VK1: ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDLATYYCQQ SYSTPPTFGQ
A44: GTKLEIK
VK1: GTKVEIK

Выравнивание ЛЦ A44 с v-лямбда-3:

A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITXKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
VL3: -SYELTQPPS VSVSPGQTAS ITXSGDKLGD KYASWYQQKP GQSPVLVIYQ
A44: ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYXLQ YDEFPPTEFGG
VL3: DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEADYYXQA WDSSAVVFGG
A44: GTKLEIK
VL3: GTKLTVL

Выравнивание ТЦ А44 с vh2:

A44: EMQLQESGPS LVKPSQTLST TCSVTGDSMT --NGYWNWIR KFPGNKLEYM
VH2: QVTLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TSGVGVGWIR QPPGKALEWL
A44: GYITYSGSTY YNPSLKGRIS ITRNTSKNQY YLQLSSVTTE DTATYYCARW
VH2: ARIDWDDDKY YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARM
A44: HYGSPYYFDY WGQGTTLTVSS
VH2: GFTG-TYFDY WGQGTTLTVSS

Выравнивание ТЦ А44 с vh4:

A44: EMQLQESGPS LVKPSQTLST TXSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGNKLEYMGY
VH4: QVQLQESGPG LVKPSETLSL TXTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
A44: ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL QLSSVTTEDT ATYYXARWHY
VH4: IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYXARGDS
A44: GSPYYFDYWG QGTTLTVSS
VH4: SG-YYFDYWG QGTTLTVSS

Клон	Исходник	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
МуА44-VL	конструкция	D	I	K	M	T	Q	S	P	S	S	S	M	Y	A	S	L	G	E	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K					
МуА44-VL	LC1a	D	I	K	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						
МуА44-VL	LC1b	D	I	K	M	T	Q	S	P	S	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						
МуА44-VL	LC2	D	I	K	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						
МуА44-VL	LC3	D	I	K	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						
МуА44-VL	LC4	D	I	K	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						
МуА44-VL	LC5a	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						
МуА44-VL	LC5b	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						
МуА44-VL	LC5c	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S	W	L	Q	Q	K						

Клон	Исходник	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
МуА44-VL	конструкция	P	G	K	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	S	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T				
МуА44-VL	LC1a	P	G	K	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	S	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T						
МуА44-VL	LC1b	P	G	Q	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	S	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T						
МуА44-VL	LC2	P	G	K	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	Q	R	S	V	E	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T						
МуА44-VL	LC3	P	G	K	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	S	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T						
МуА44-VL	LC4	P	G	K	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	Q	R	S	V	E	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T						
МуА44-VL	LC5a	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	A	N	R	S	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	T	F	T						
МуА44-VL	LC5b	P	G	K	A	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	S	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	T	F	T						
МуА44-VL	LC5c	P	G	Q	A	P	R	T	L	I	Y	R	A	N	R	S	V	D	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	T	L	T						

Клон	Исходник	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
МуА44-VL	конструкция	I	S	S	L	E	Y	E	D	M	G	I	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K				
МуА44-VL	LC1a	I	S	S	L	Q	P	E	D	L	G	I	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K				
МуА44-VL	LC1b	I	S	S	L	Q	A	M	D	E	G	I	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K				
МуА44-VL	LC2	I	S	S	L	Q	P	E	D	L	G	I	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K				
МуА44-VL	LC3	I	S	S	L	Q	P	E	D	L	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K				
МуА44-VL	LC4	I	S	S	L	Q	P	E	D	L	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K				
МуА44-VL	LC5a	I	S	S	L	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K				
МуА44-VL	LC5b	I	S	S	L	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K				
МуА44-VL	LC5c	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K				

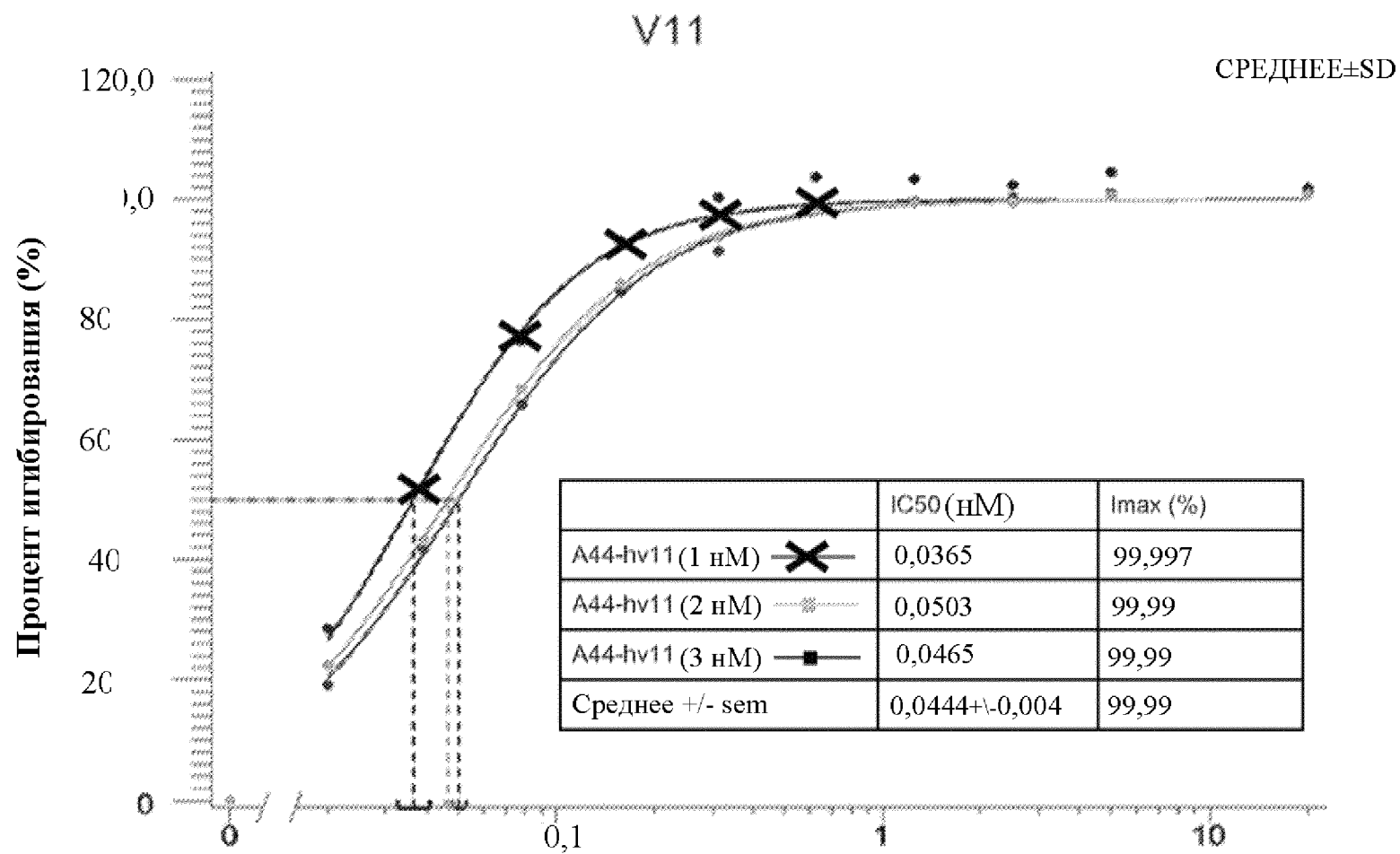
ФИГ. 15

Клон	Исходник	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
MuA44-VH	конструкция	E	M	Q	L	Q	E	S	G	P	S	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F	
MuA44-VH	HC1a	E	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F	
MuA44-VH	HC1b	E	M	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F	
MuA44-VH	HC2a	E	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	E	S	M	T	Q	G	Y	W	N	W	I	R	K	F	
MuA44-VH	HC2b	E	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	Q	G	Y	W	N	W	I	R	K	F	
MuA44-VH	HC3	Q	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	F	
MuA44-VH	HC4	Q	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	S	G	E	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	F	
MuA44-VH	HC5a	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	P	
MuA44-VH	HC5b	Q	M	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	P	
MuA44-VH	HC5c	Q	M	Q	L	Q	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	A	I	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	S

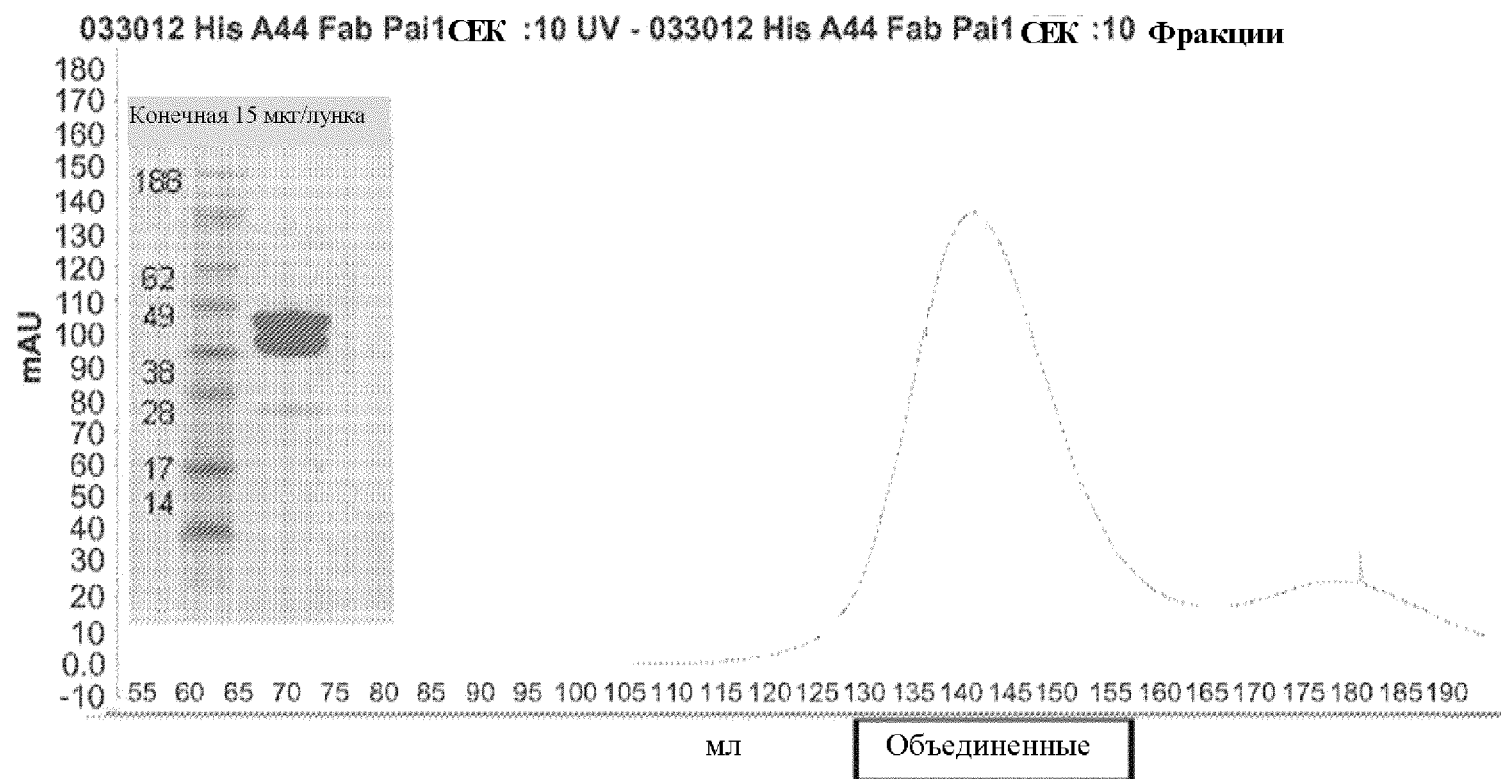
Клон	Исходник	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
MuA44-VH	конструкция	P	G	N	K	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	Q
MuA44-VH	HC1a	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T
MuA44-VH	HC1b	P	G	K	G	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	K
MuA44-VH	HC2a	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T
MuA44-VH	HC2b	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T
MuA44-VH	HC3	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	T	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T
MuA44-VH	HC4	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	T	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T
MuA44-VH	HC5a	P	G	K	G	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	T	I	S	R	N	T	S	K	N	Q	Y	S	L	K
MuA44-VH	HC5b	P	G	K	G	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	T	I	S	R	N	T	S	K	N	Q	Y	S	L	K
MuA44-VH	HC5c	P	S	R	G	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	A	V	S	V	K	S	R	I	T	I	N	R	D	T	S	K	N	Q	Y	S	L	Q

Клон	Исходник	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
MuA44-VH	конструкция	L	S	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
MuA44-VH	HC1a	L	S	S	V	T	T	V	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
MuA44-VH	HC1b	L	S	S	V	T	T	A	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
MuA44-VH	HC2a	L	S	S	V	T	T	V	E	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
MuA44-VH	HC2b	L	S	S	V	T	T	V	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
MuA44-VH	HC3	L	S	S	V	T	T	V	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
MuA44-VH	HC4	L	S	S	V	T	T	V	E	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
MuA44-VH	HC5a	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
MuA44-VH	HC5b	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
MuA44-VH	HC5c	L	S	S	V	T	P	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

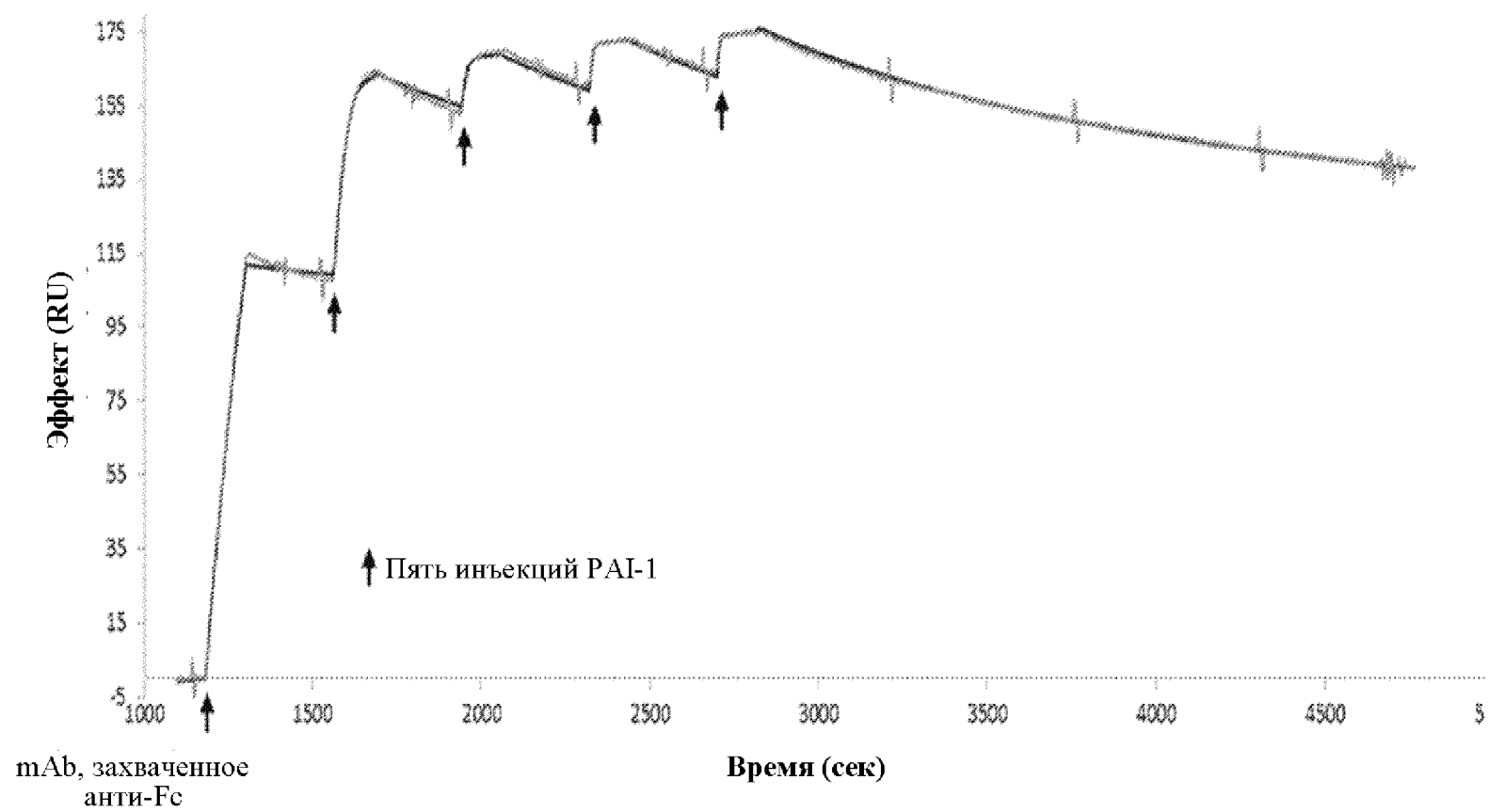
ФИГ. 16



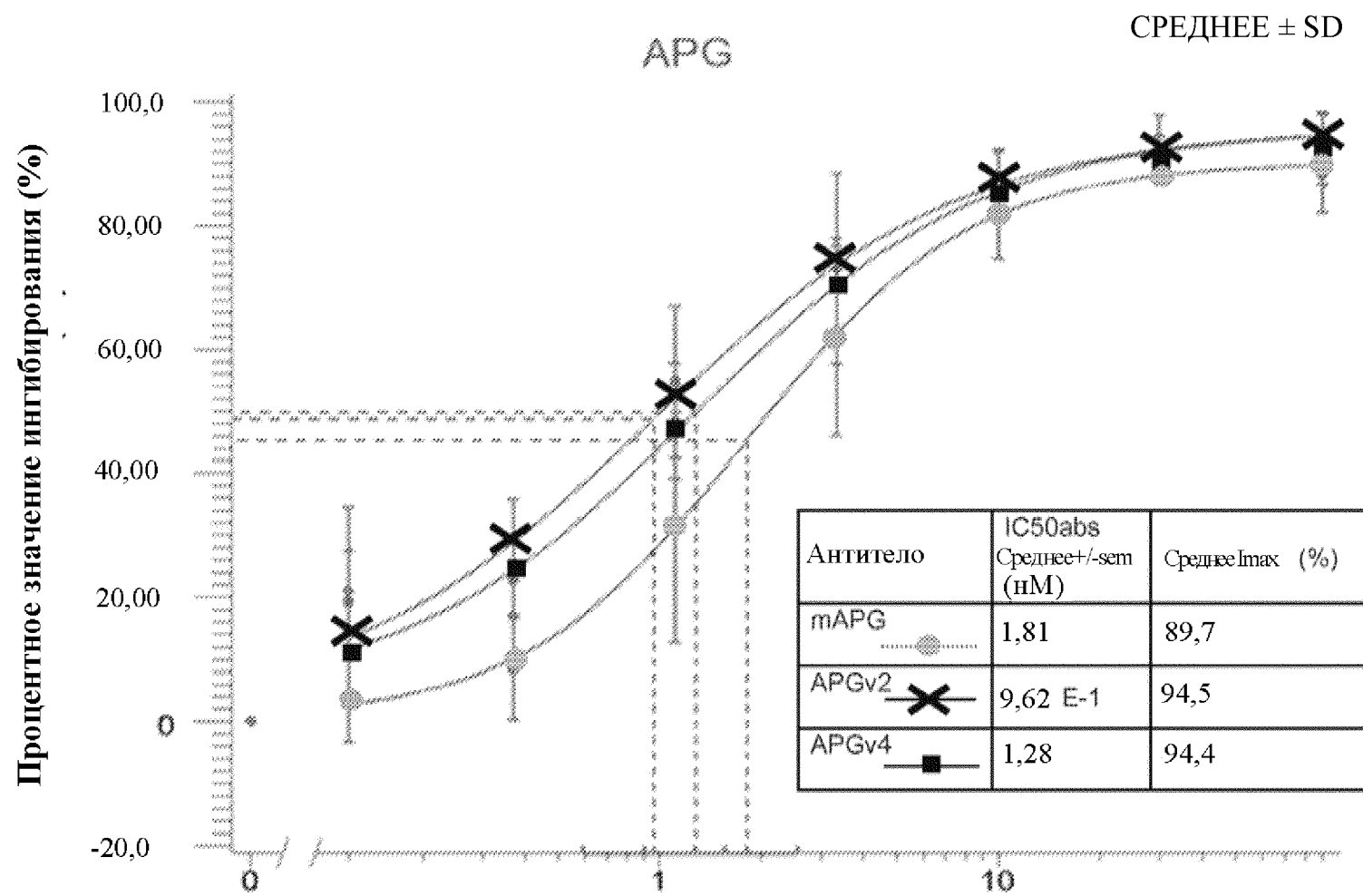
ФИГ. 17



ФИГ. 18



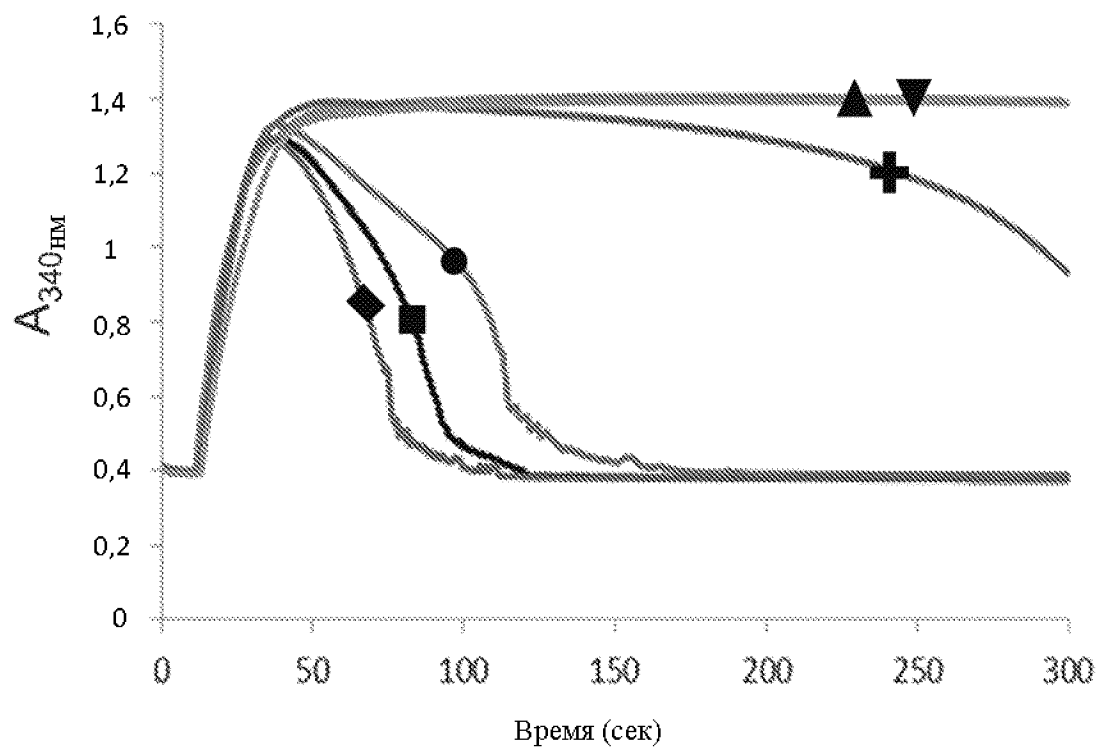
ФИГ. 19



ФИГ. 20

21/53

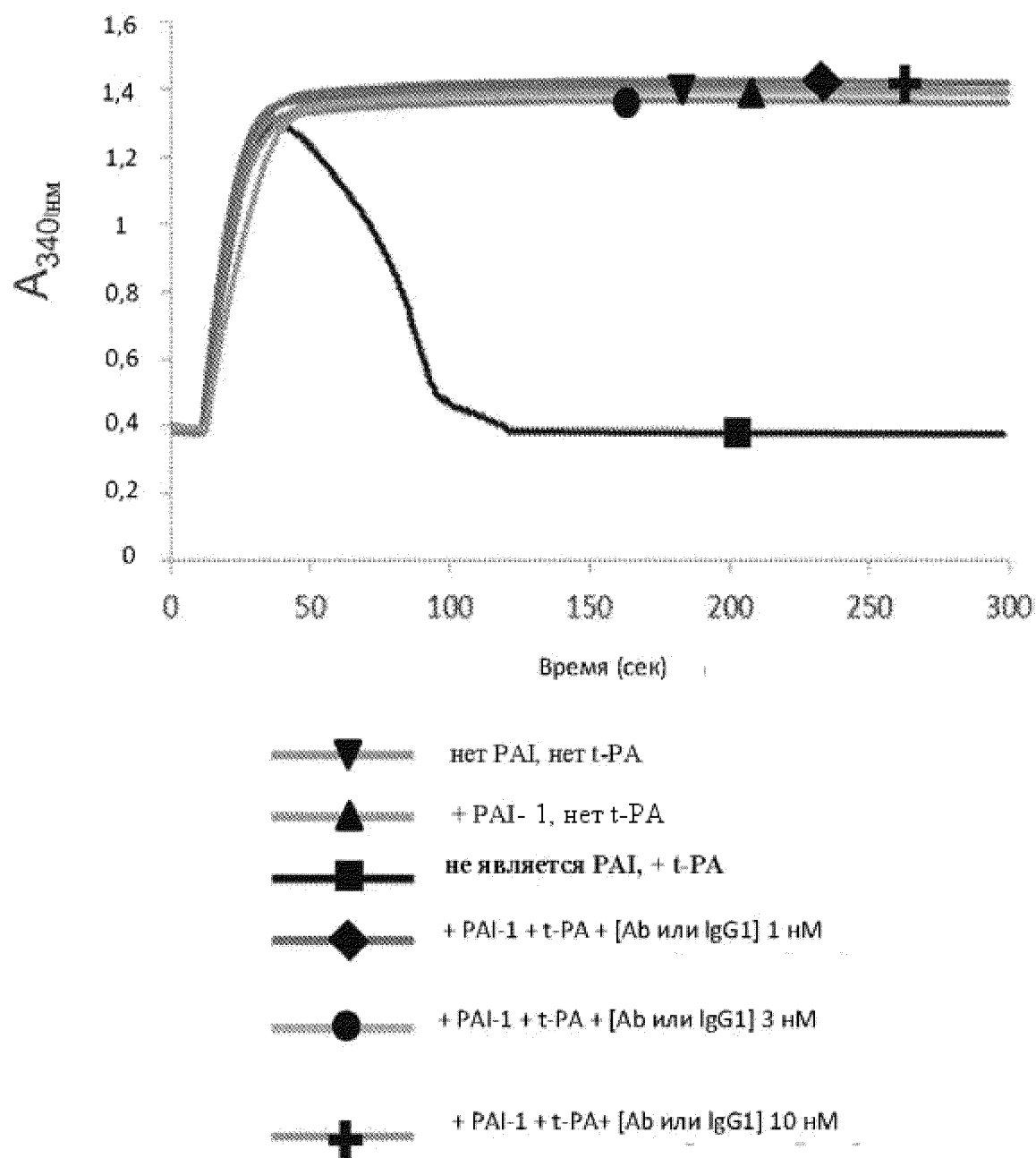
**Эффект антитела A44V11 anti-PAI на
восстановление лизиса сгустков плазмы**



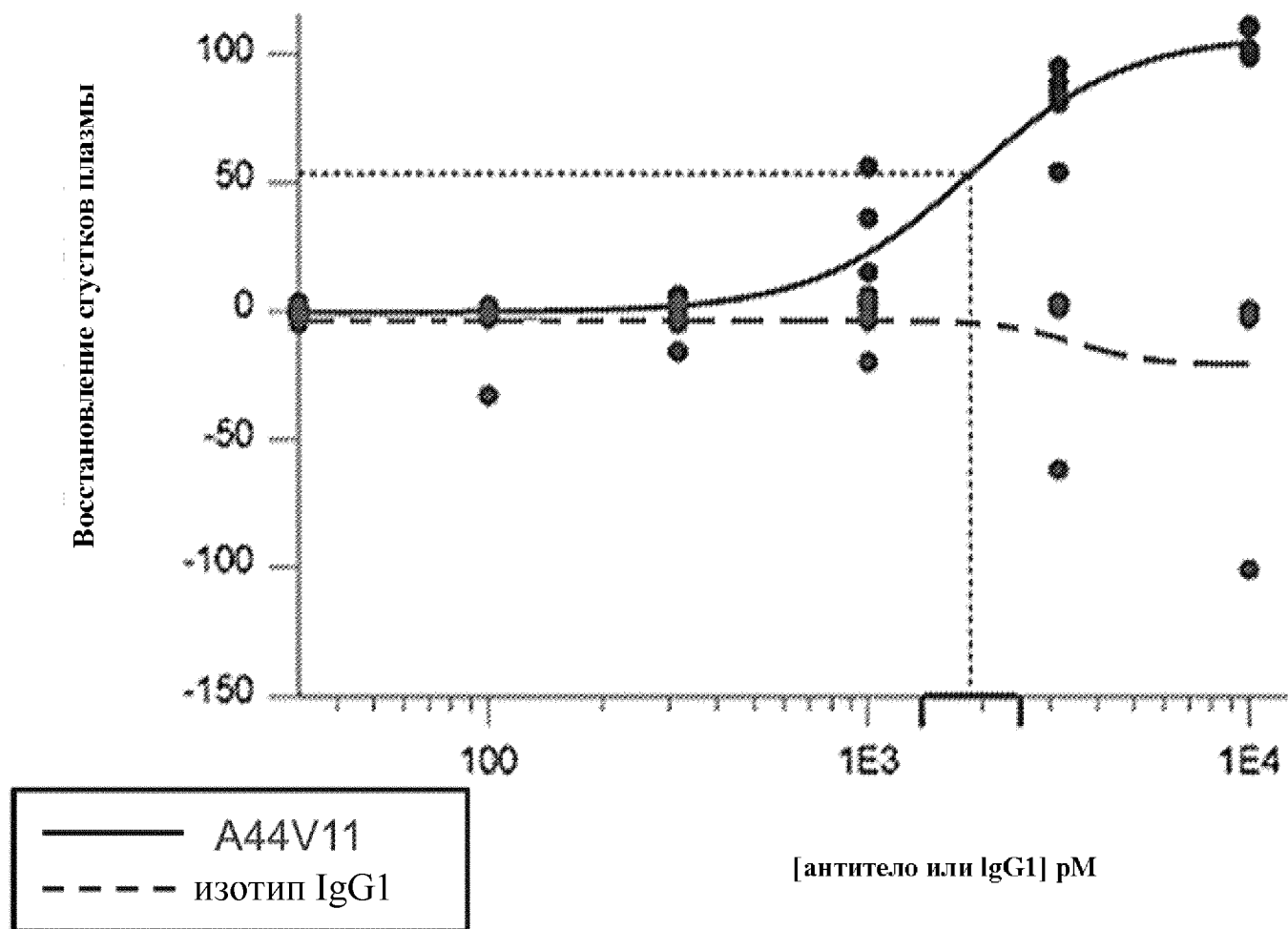
- ▼ нет PAI, нет t-PA
- ▲ + PAI, нет t-PA
- нет PAI, + t-PA
- ◆ + PAI-1 + t-PA + [Ab или IgG1] 1 нМ
- + PAI-1 + t-PA + [Ab или IgG1] 3 нМ
- ✚ + PAI-1 + t-PA + [Ab или IgG1] 10 нМ

ФИГ. 21

Эффект изотипа IgG1 на восстановление лизиса сгустков плазмы

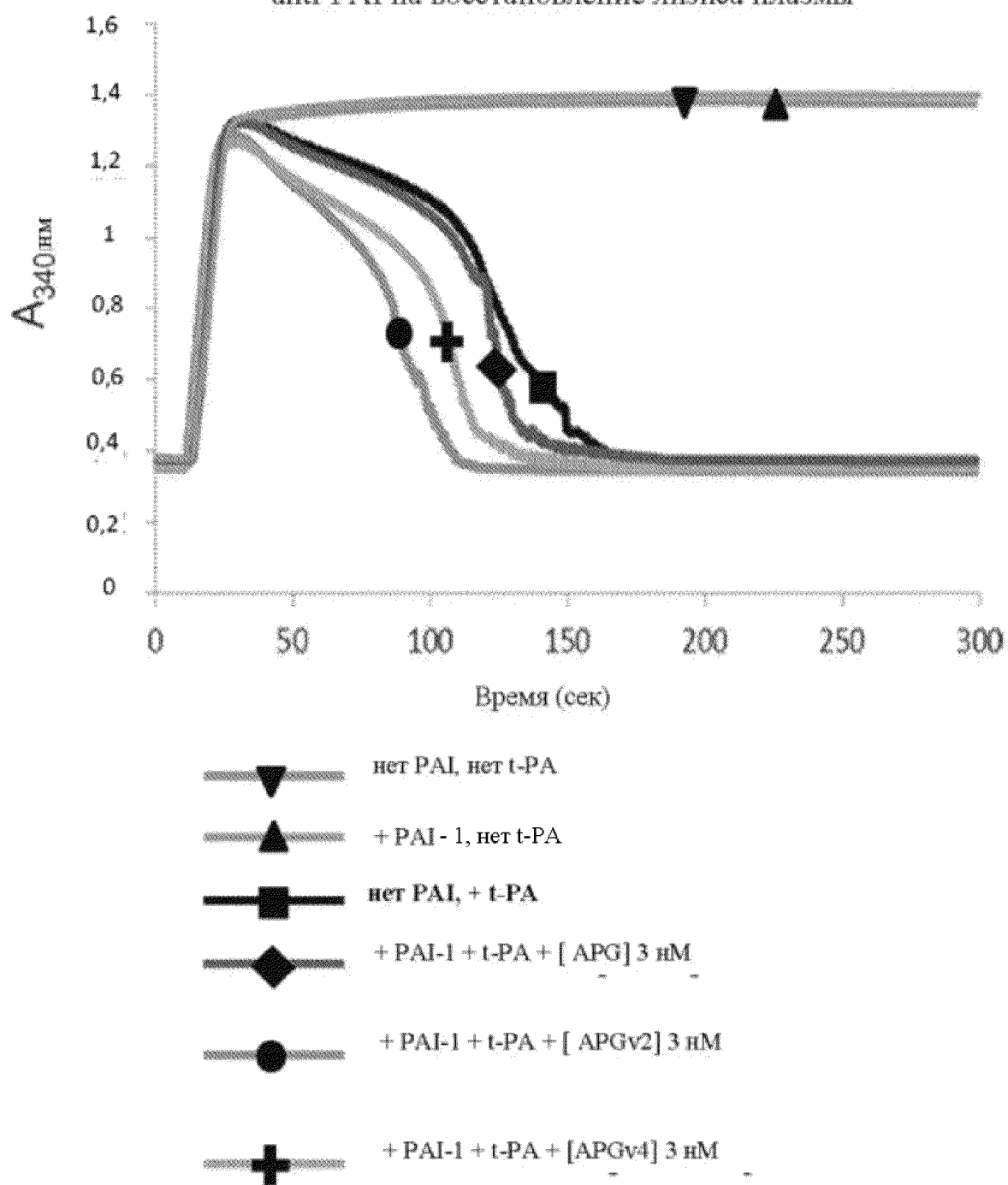


ФИГ. 22

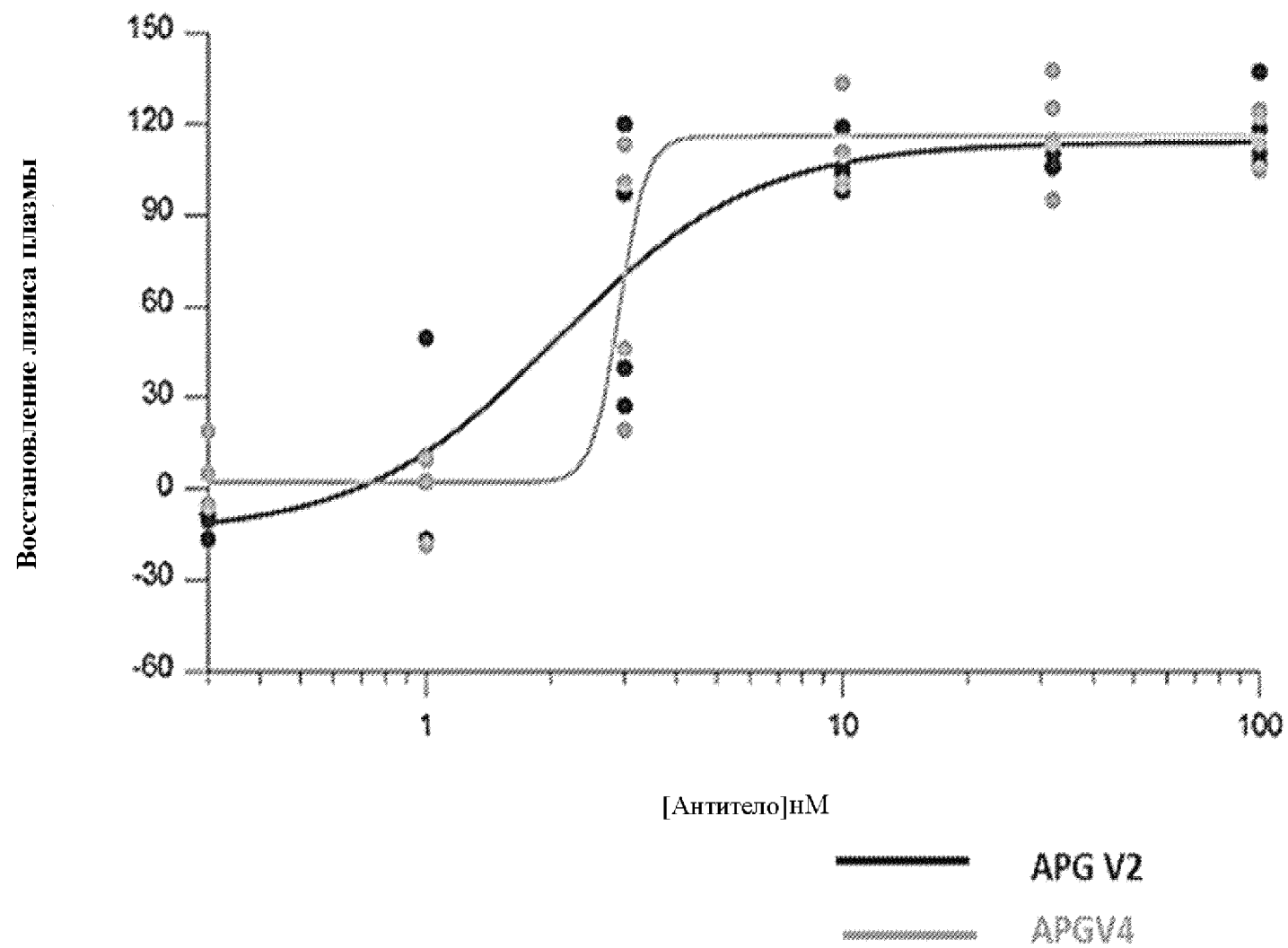


ФИГ. 23

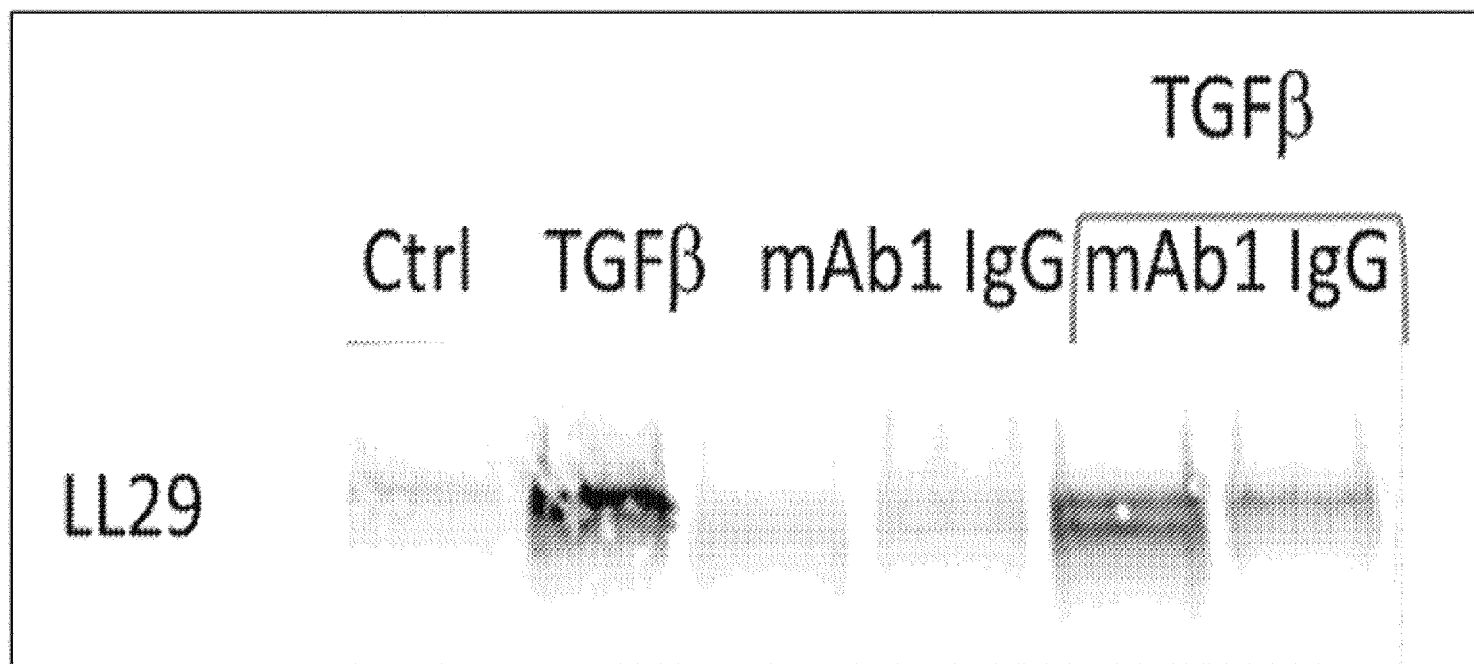
Эффект антитела природного и гуманизированного APG anti-PAI на восстановление лизиса плазмы



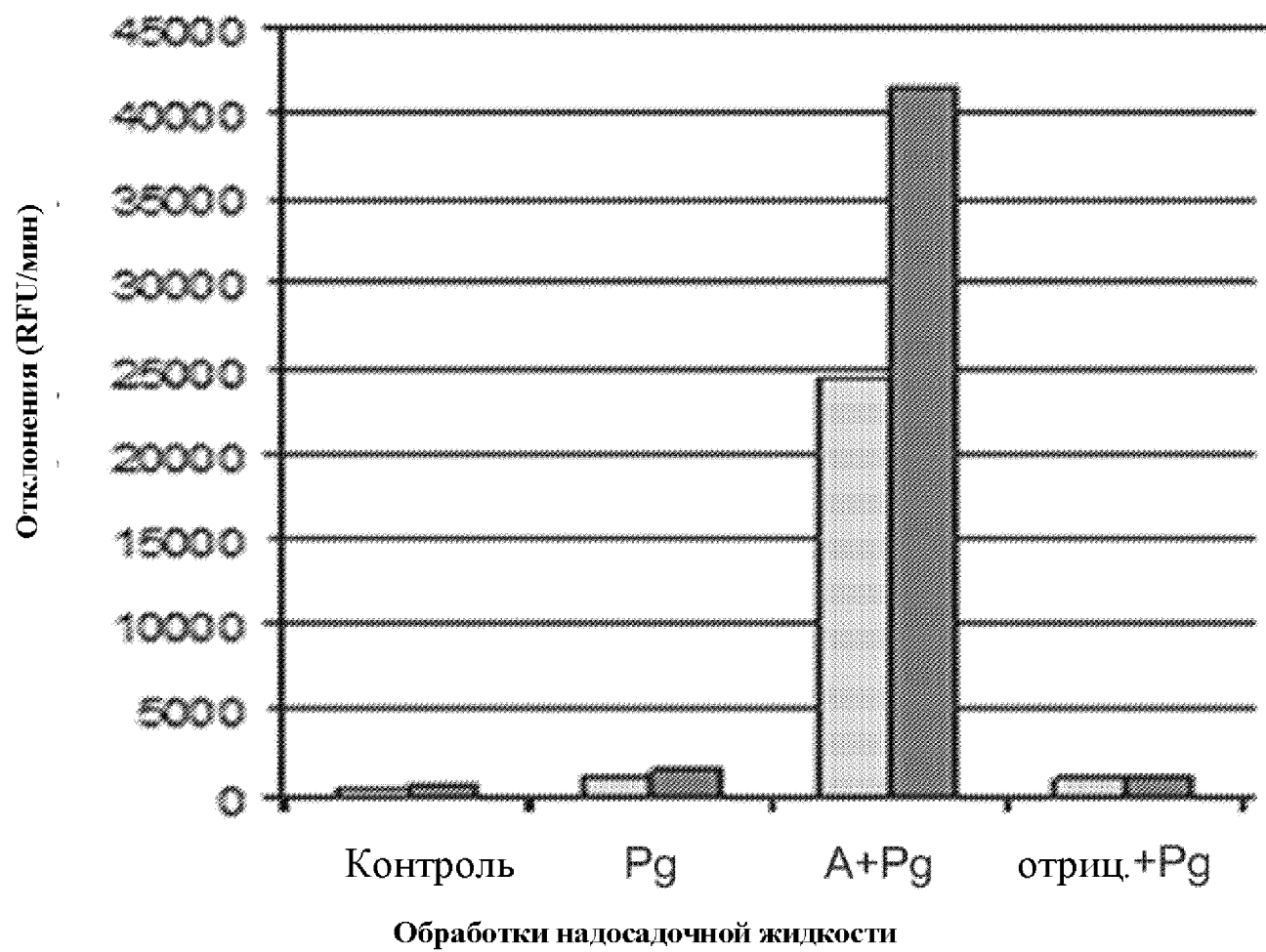
ФИГ. 24



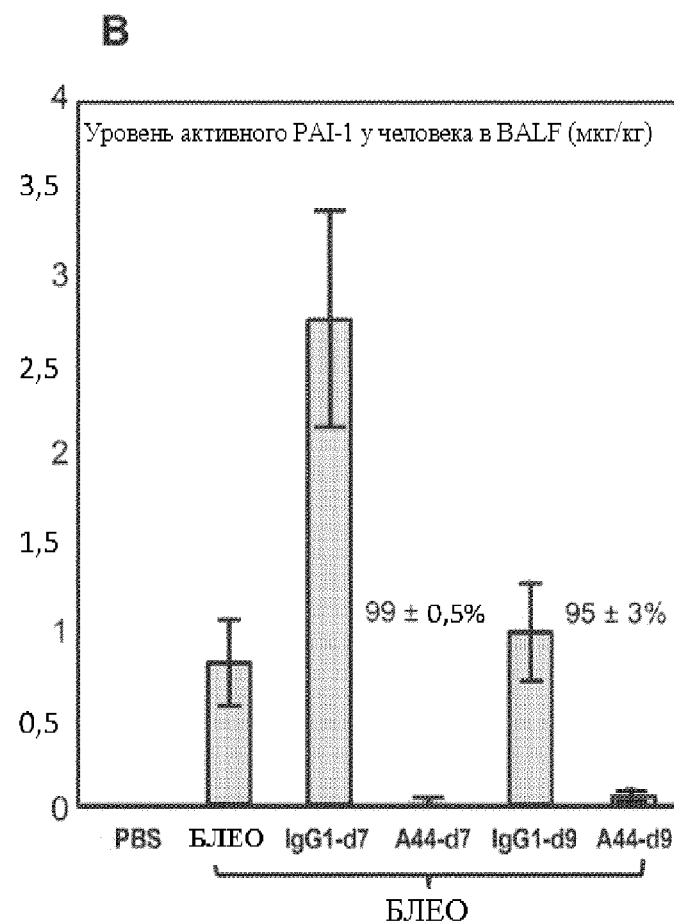
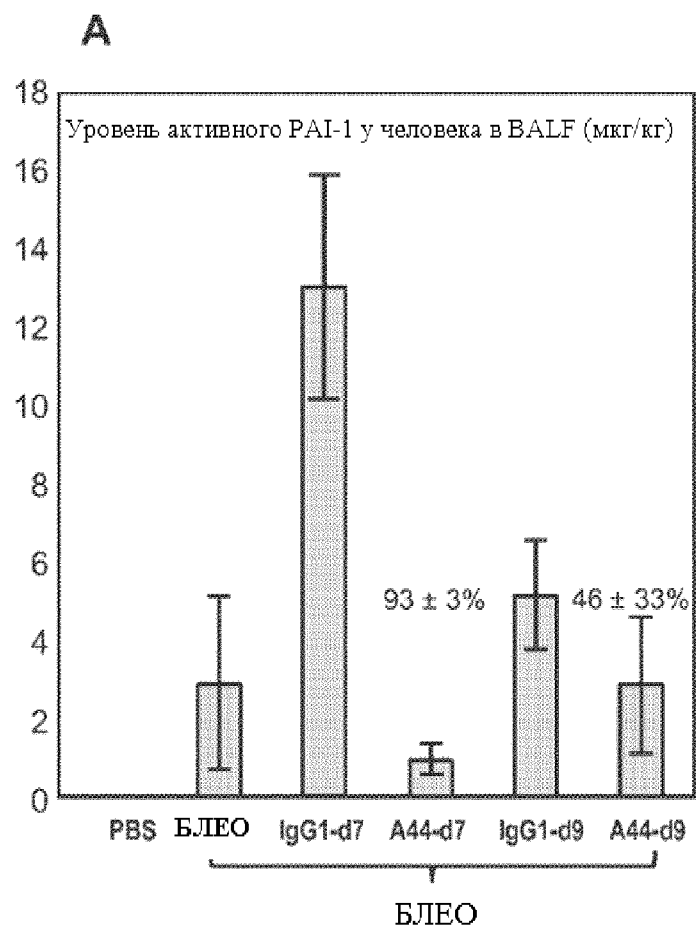
ФИГ. 25



ФИГ. 26

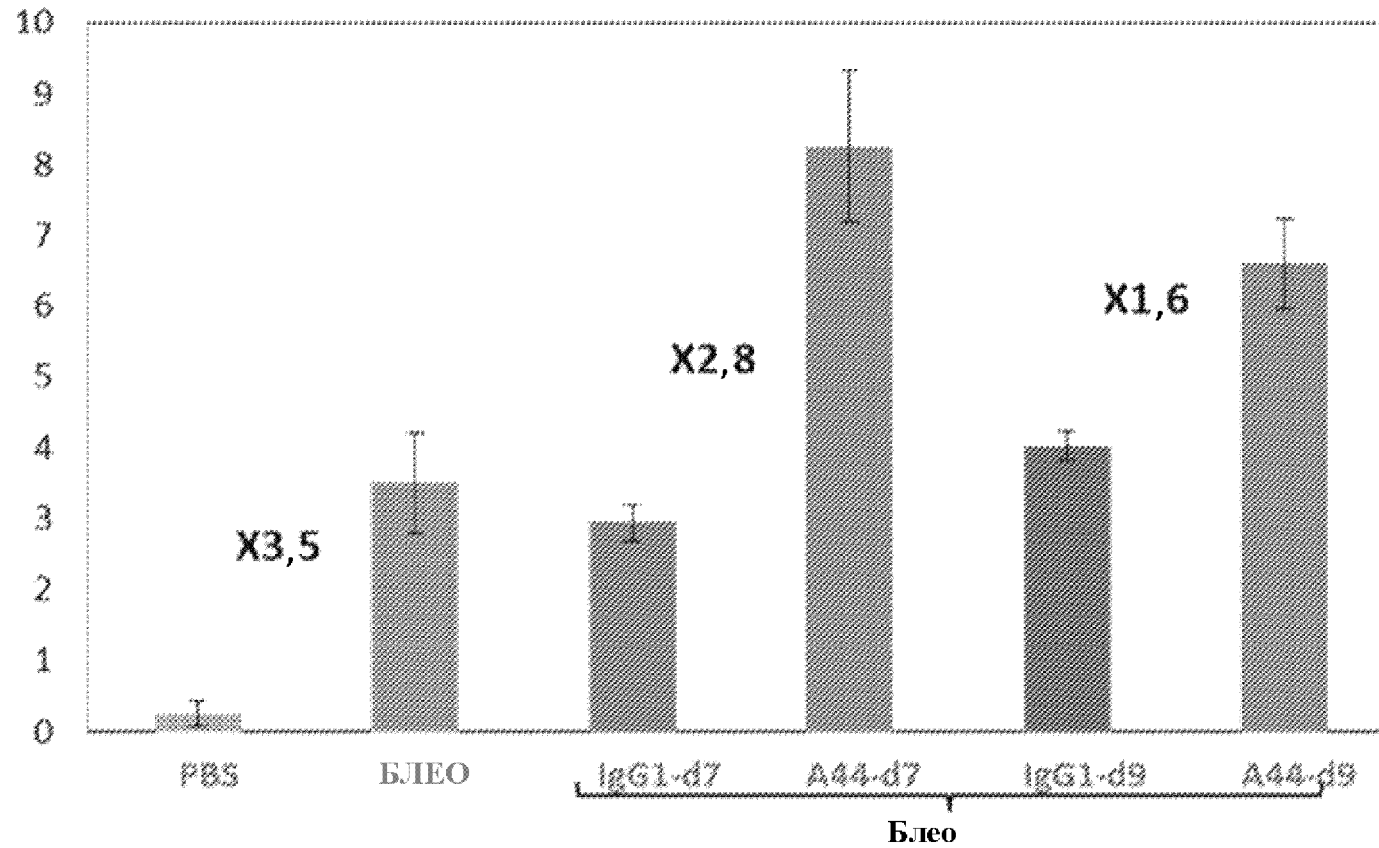


ФИГ. 27

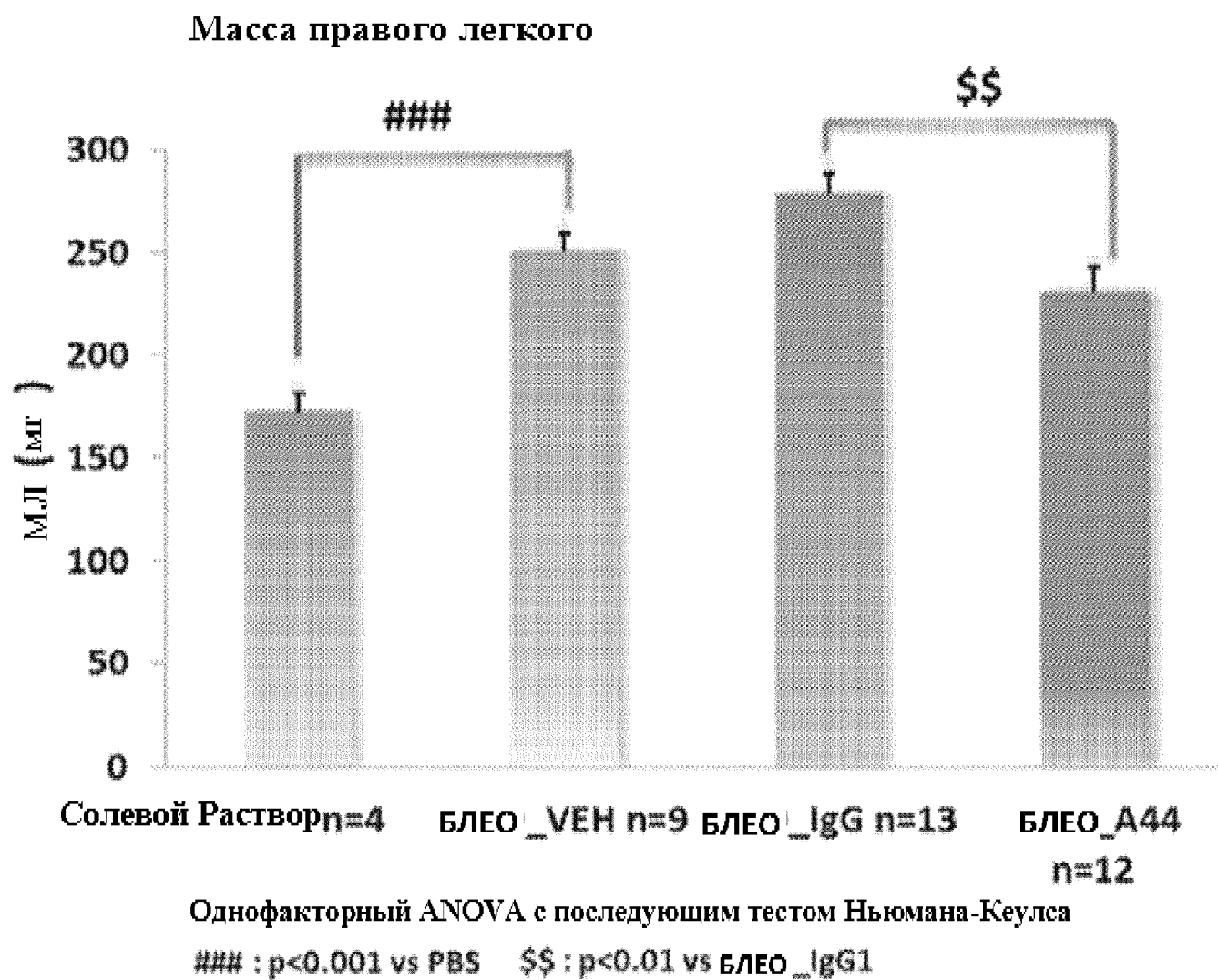


ФИГ. 28

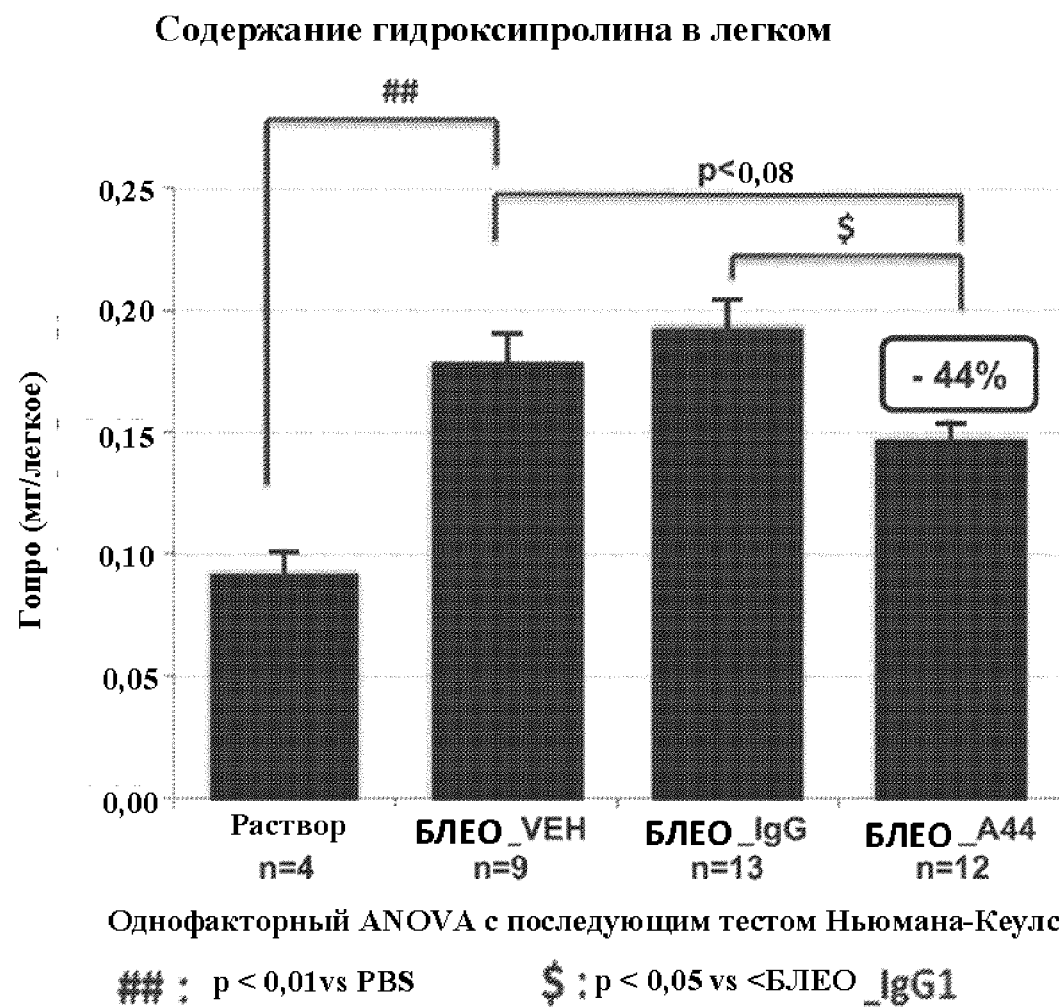
D-димер в (BALF)



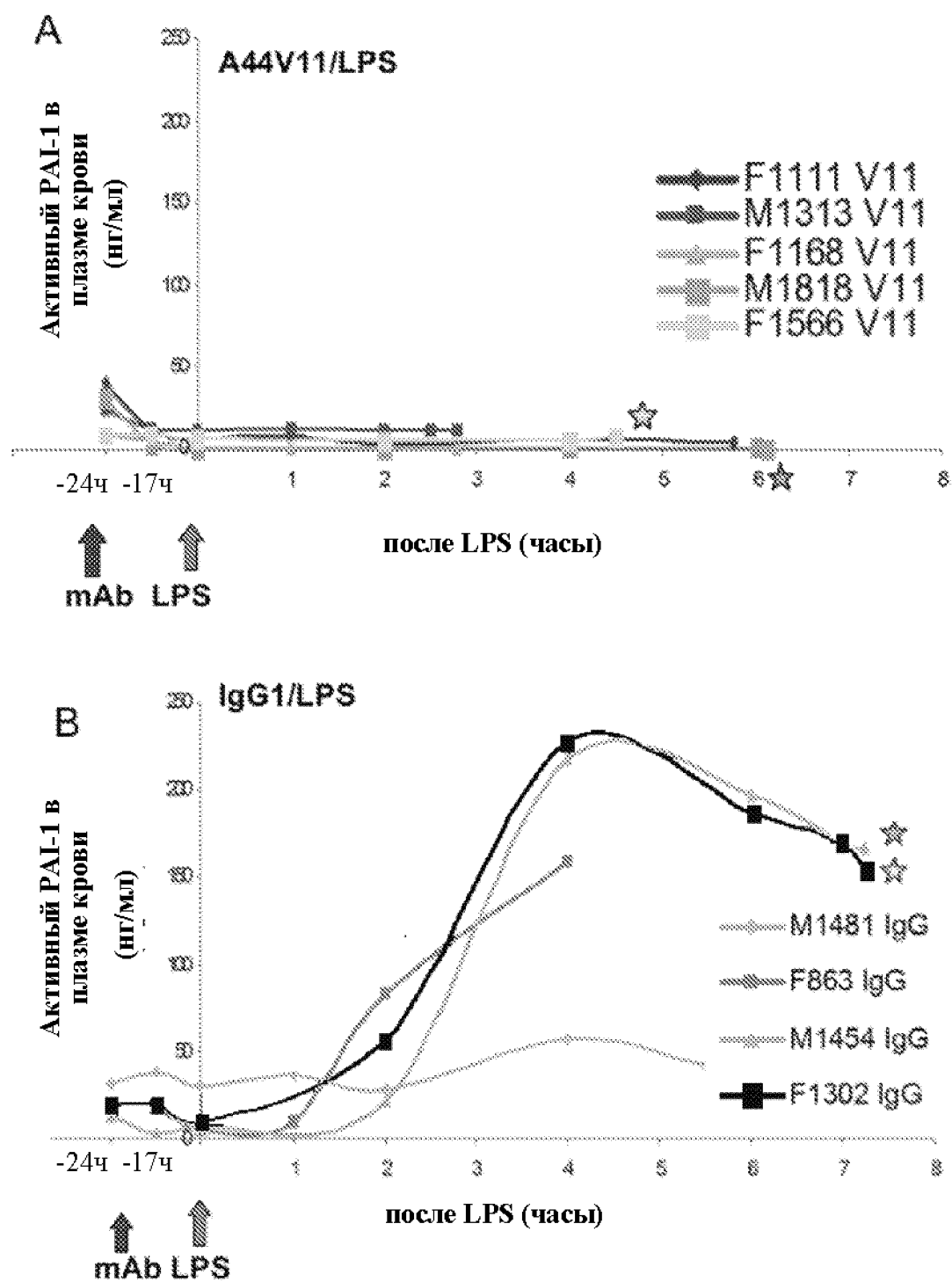
ФИГ. 29



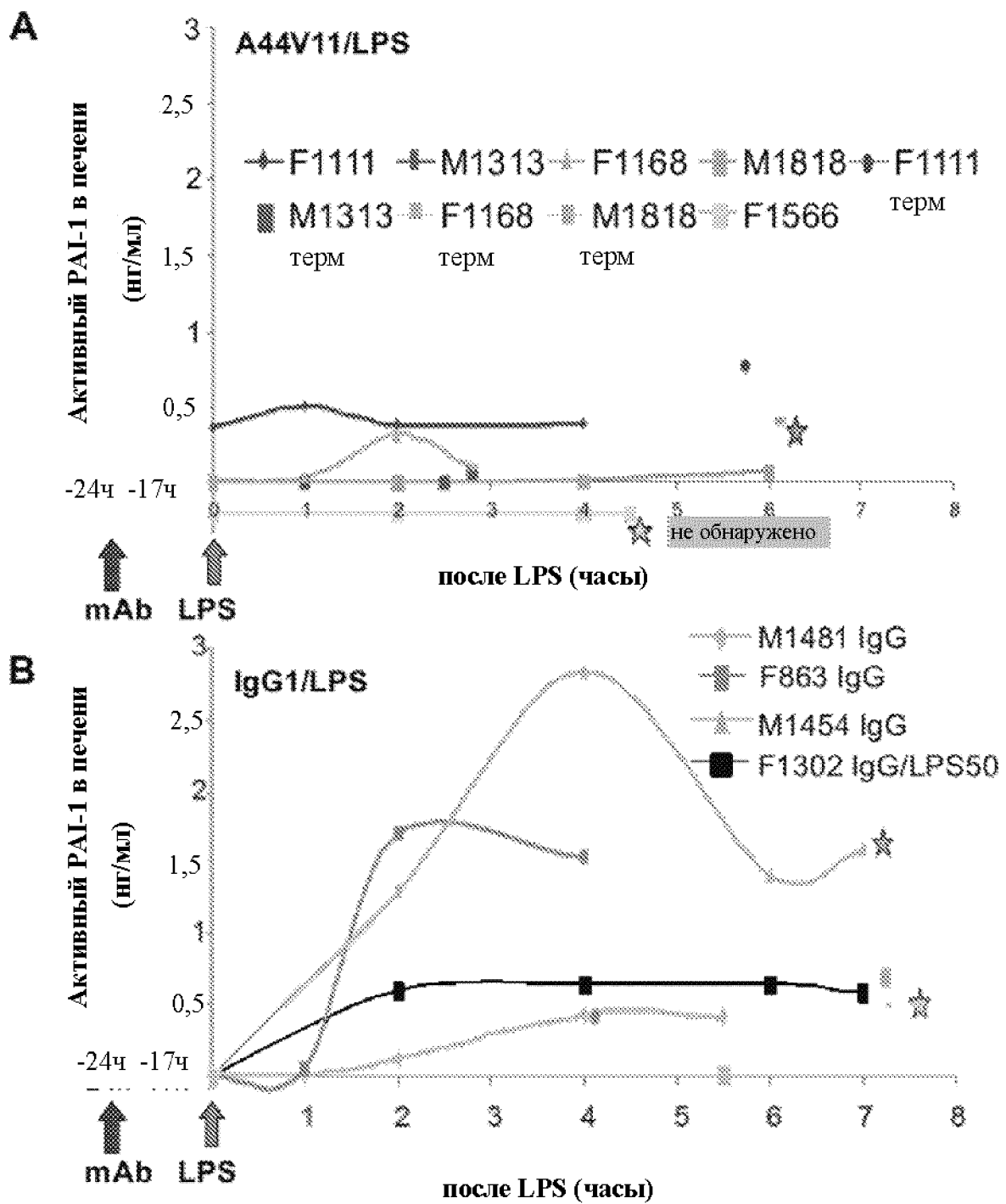
ФИГ. 30



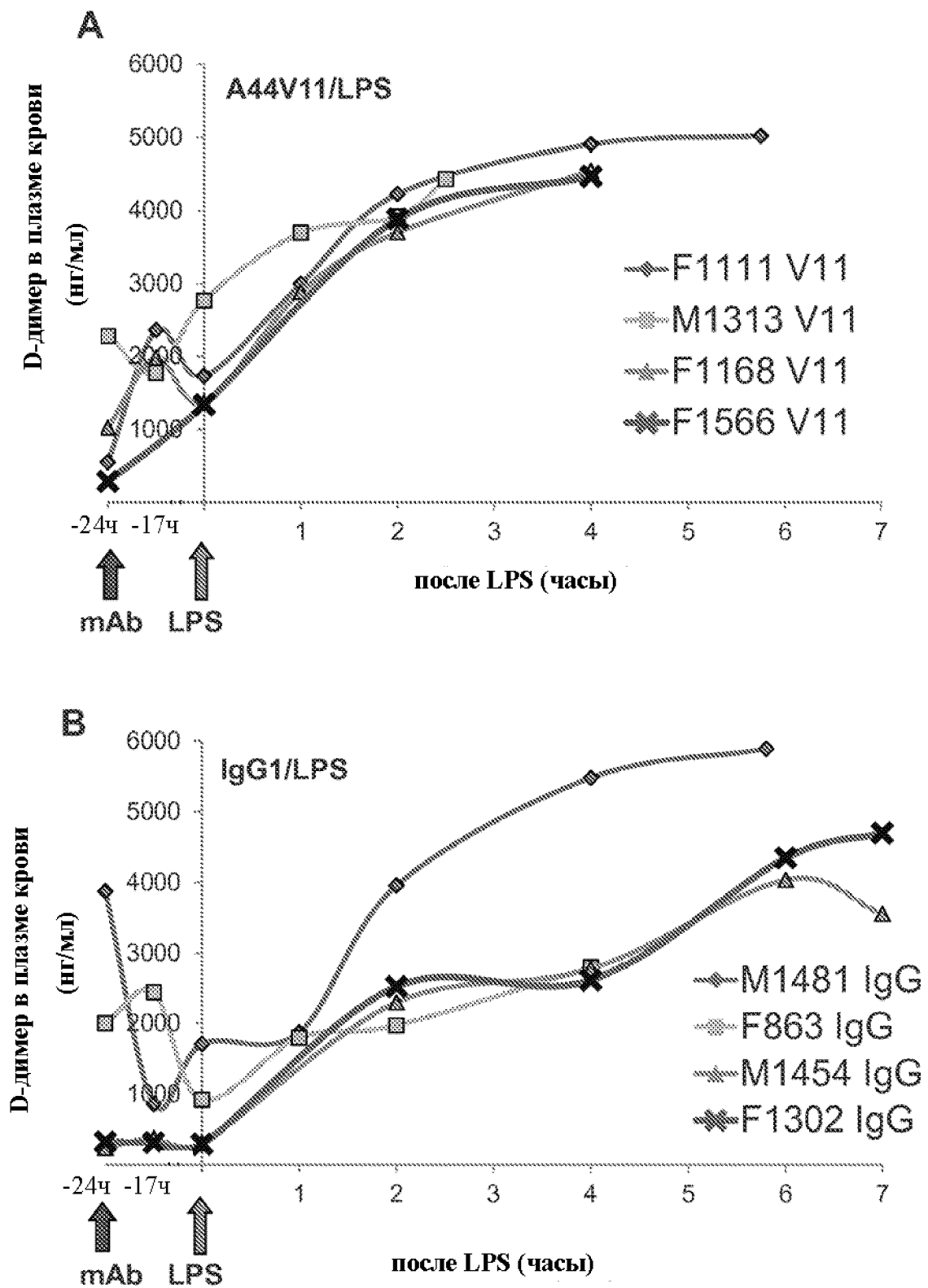
ФИГ. 31



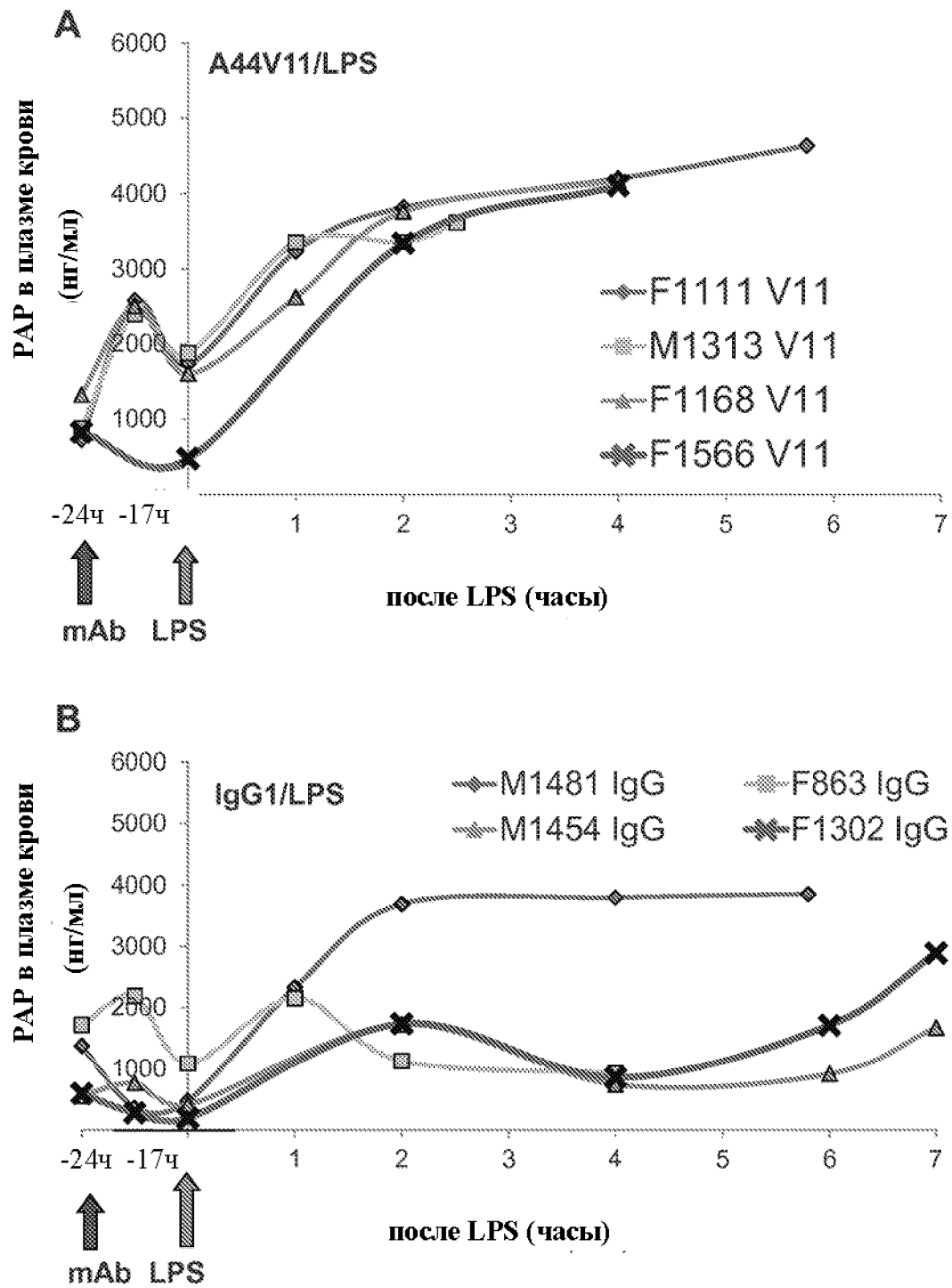
ФИГ. 32



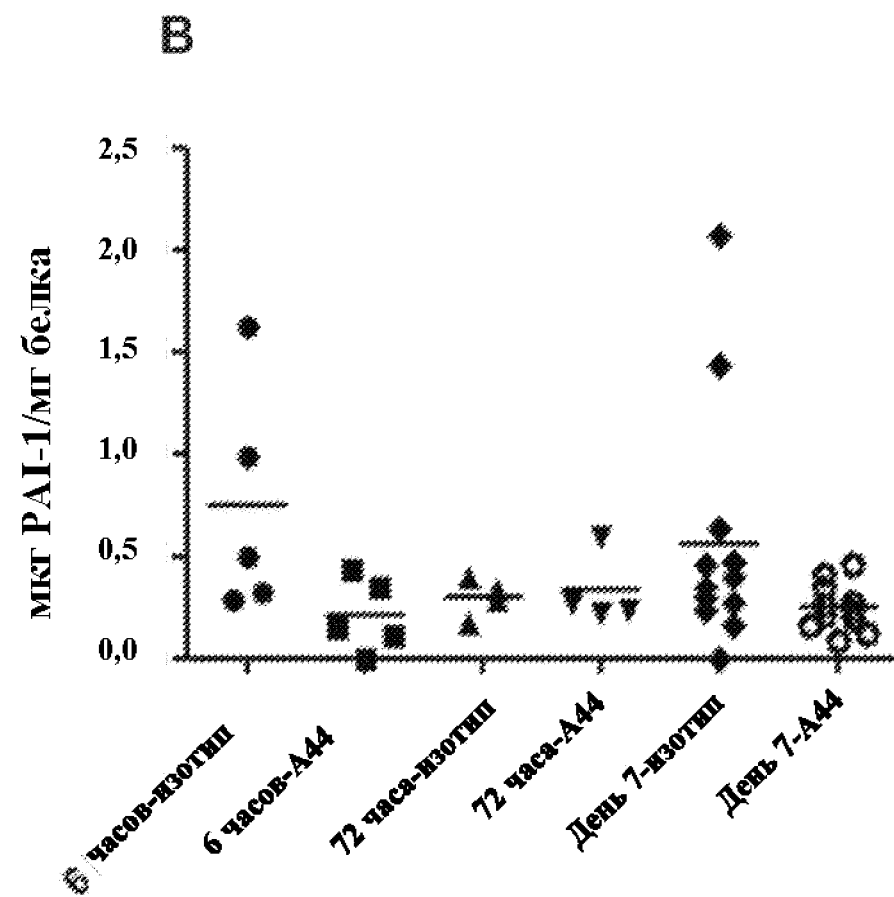
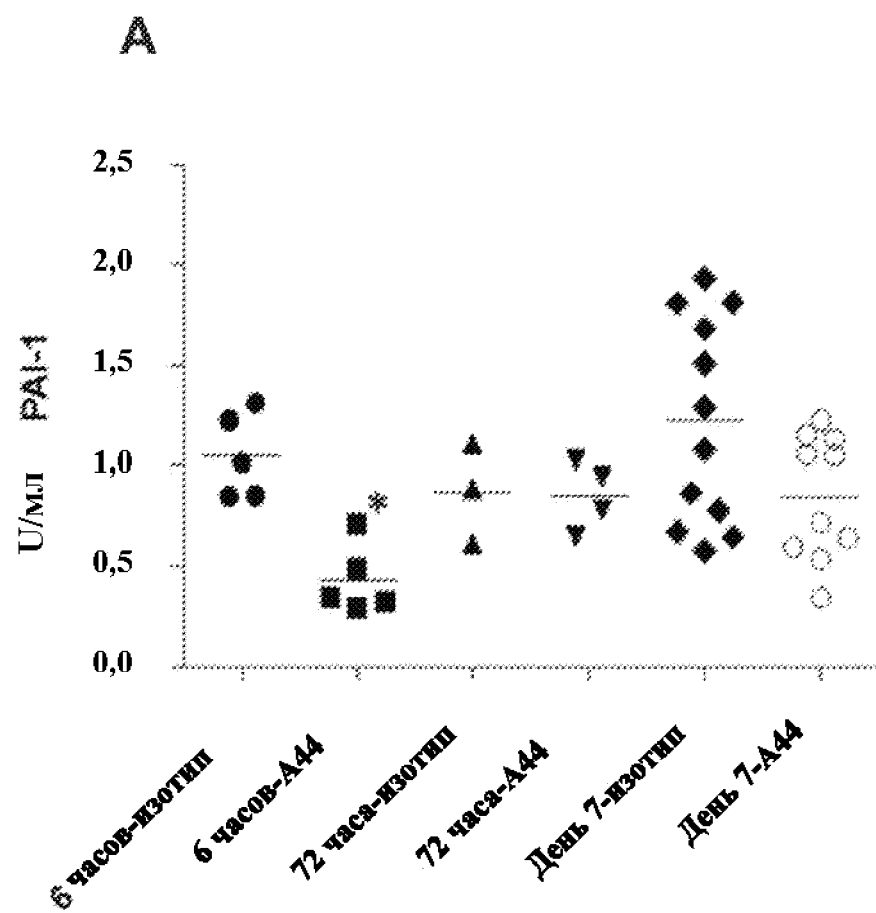
ФИГ. 33



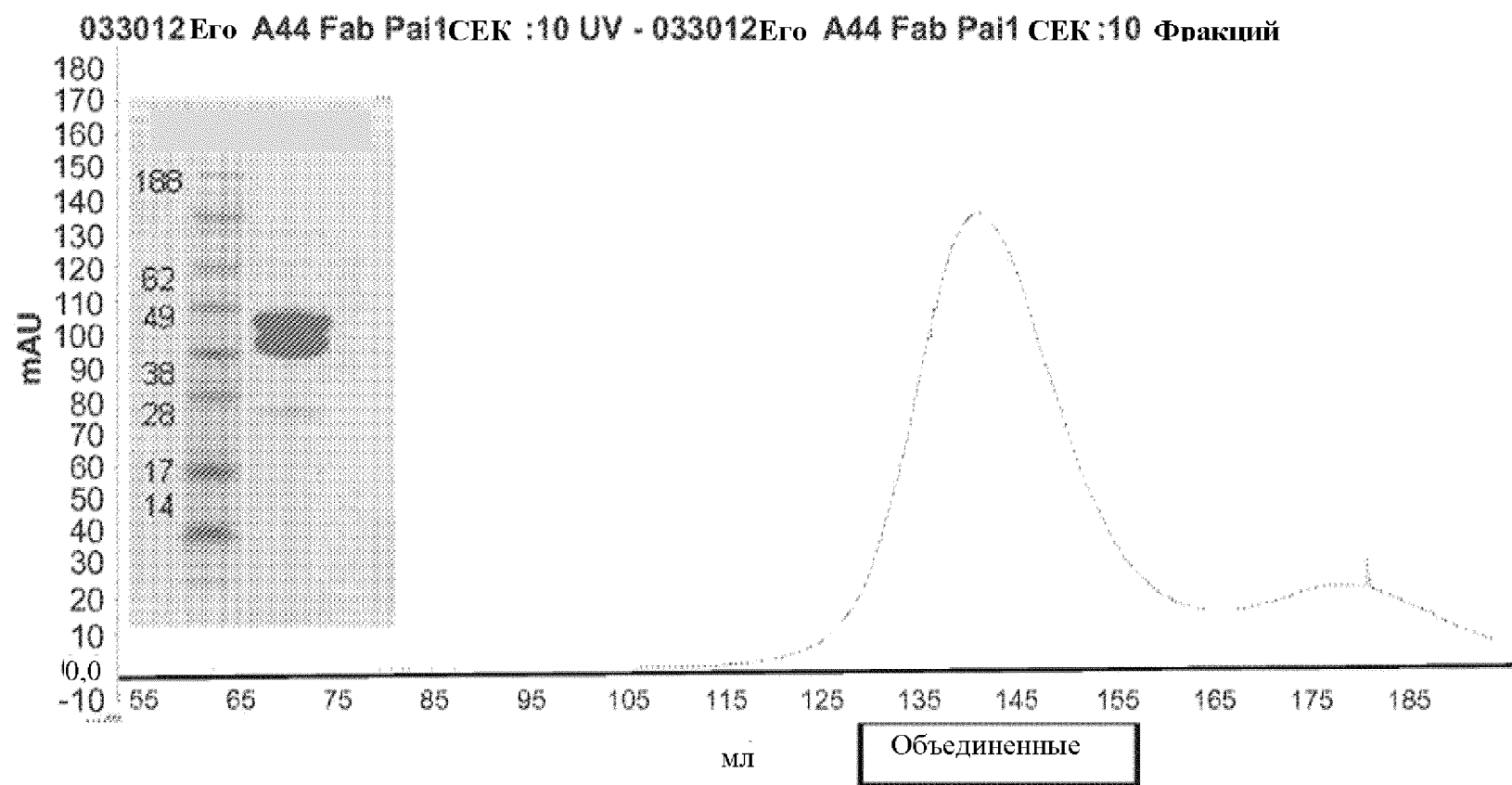
ФИГ. 34



ФИГ. 35



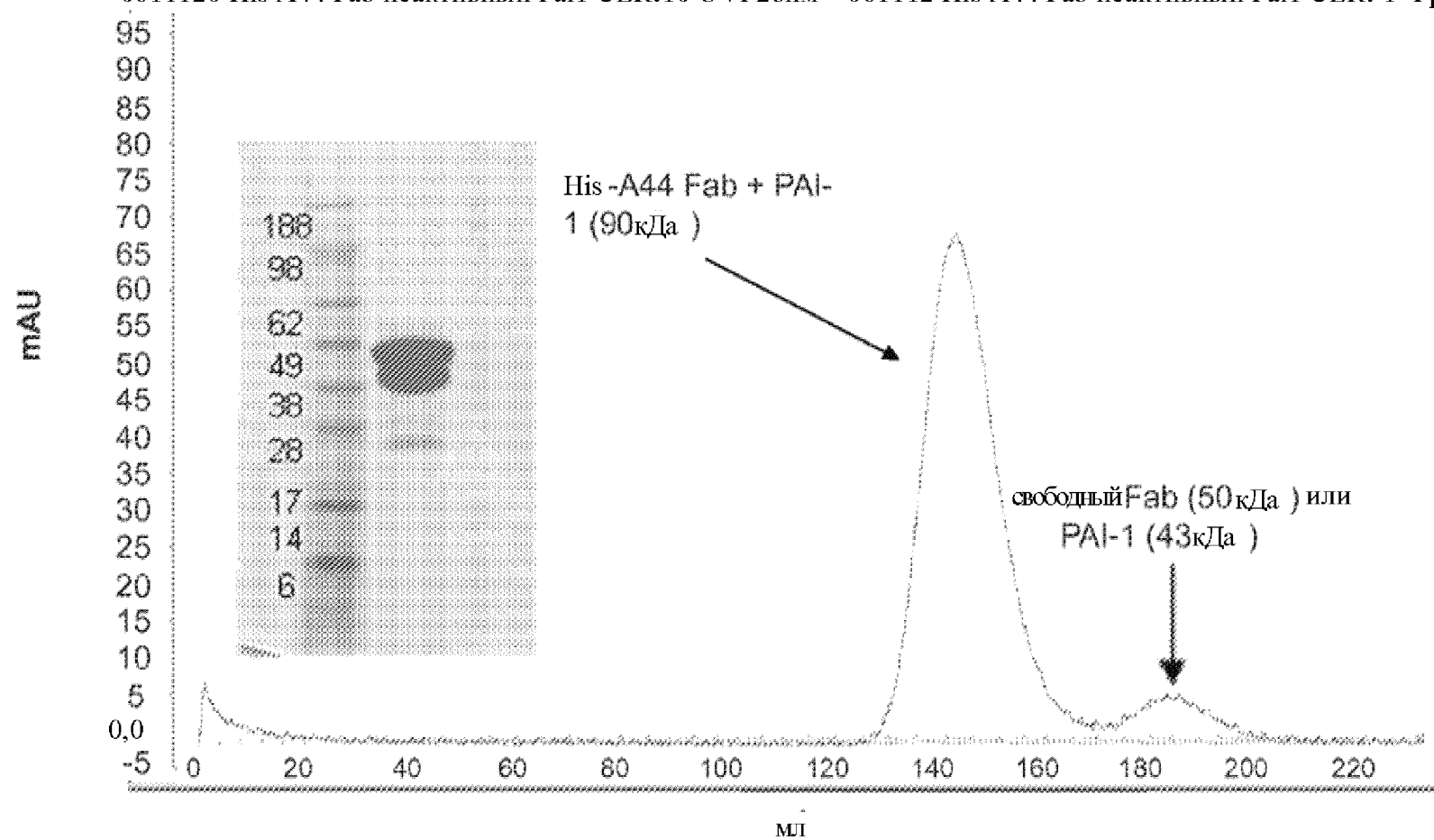
ФИГ. 36



37/53

ФИГ. 37

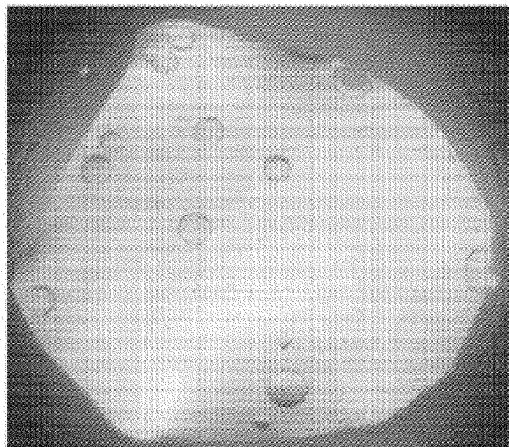
0611120 His A44 Fab неактивный Pai1 СЕК:10 UVI 28нм – 061112 His A44 Fab неактивный Pai1 СЕК: 1-Фракции



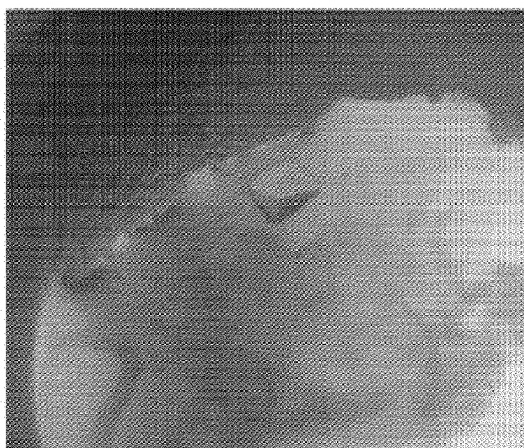
38/53

ФИГ. 38

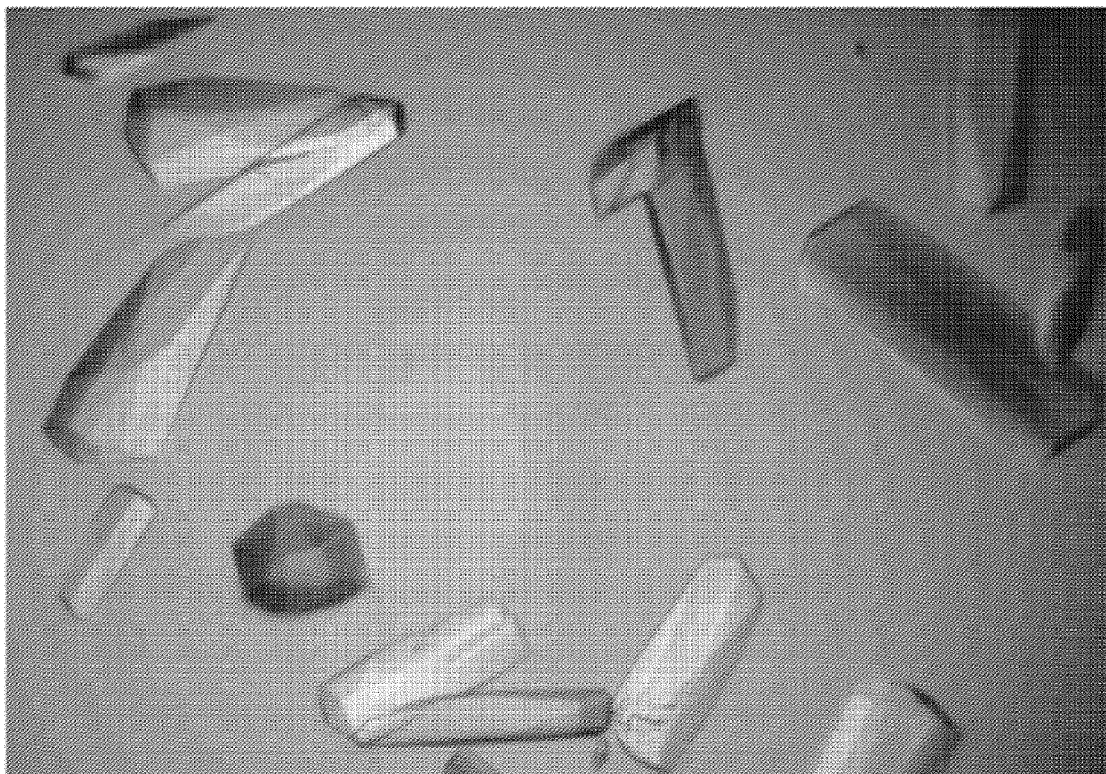
A



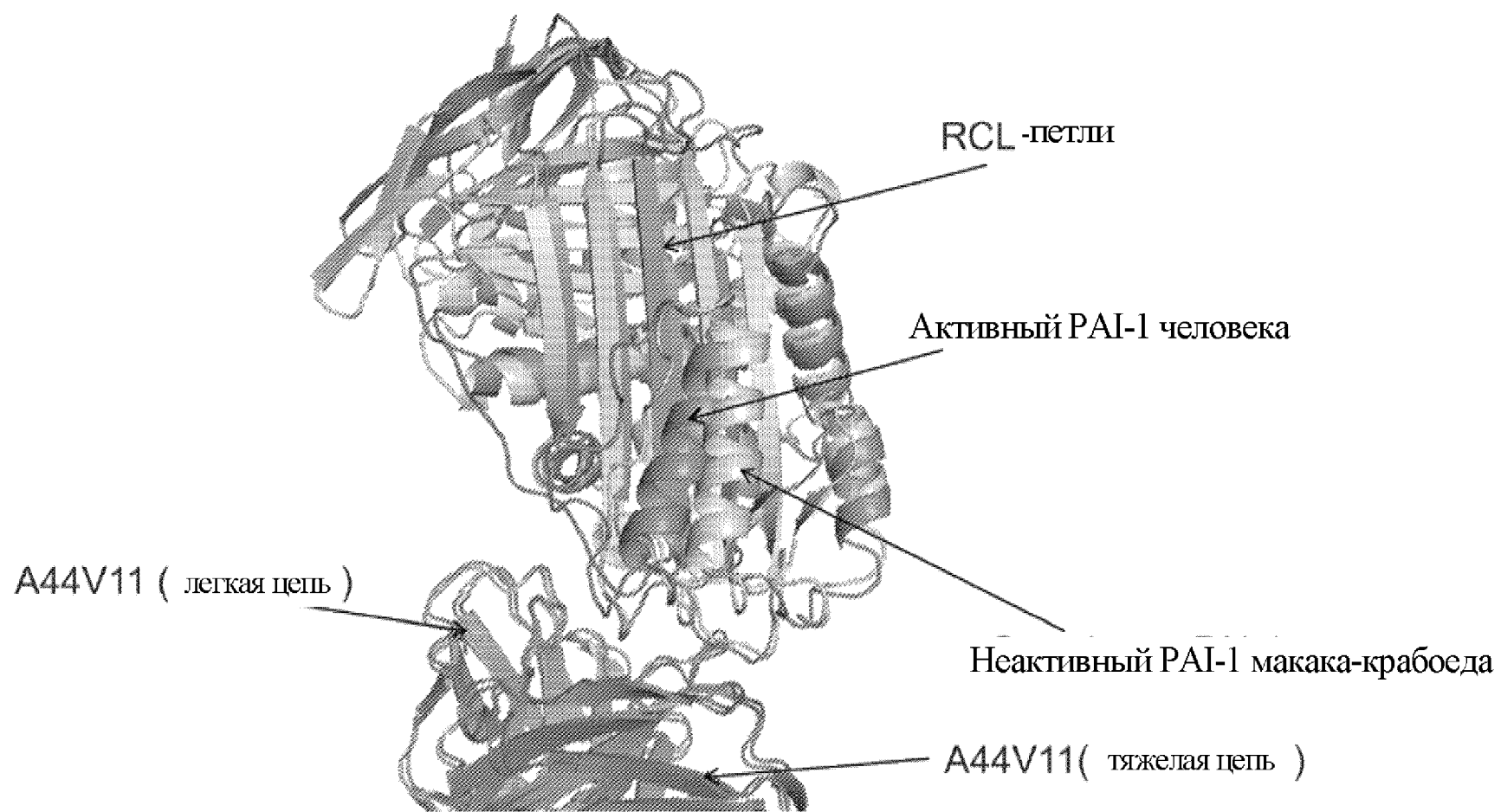
B



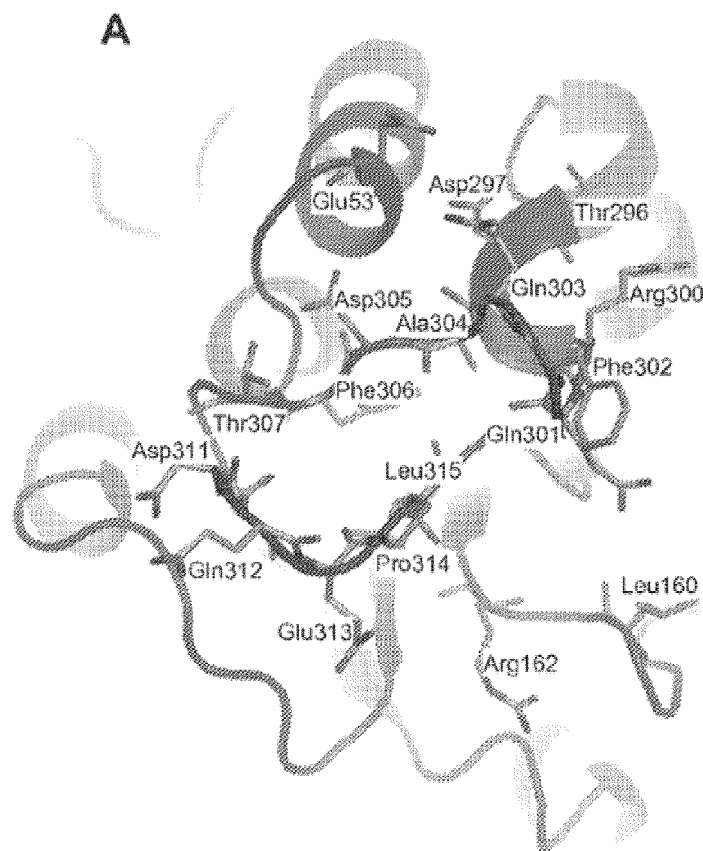
ФИГ. 39



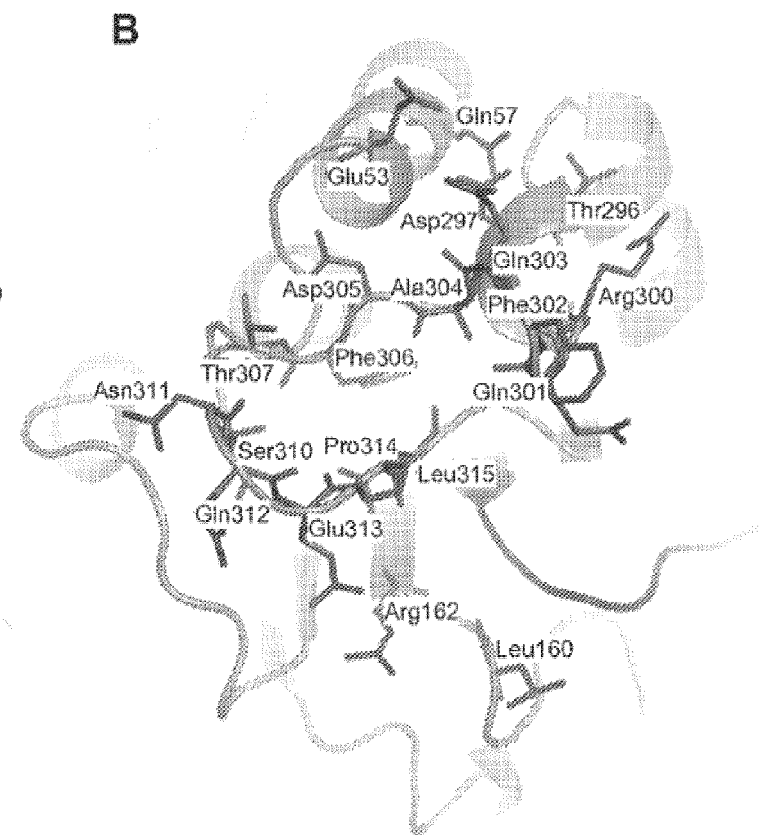
ФИГ. 40



ФИГ. 41

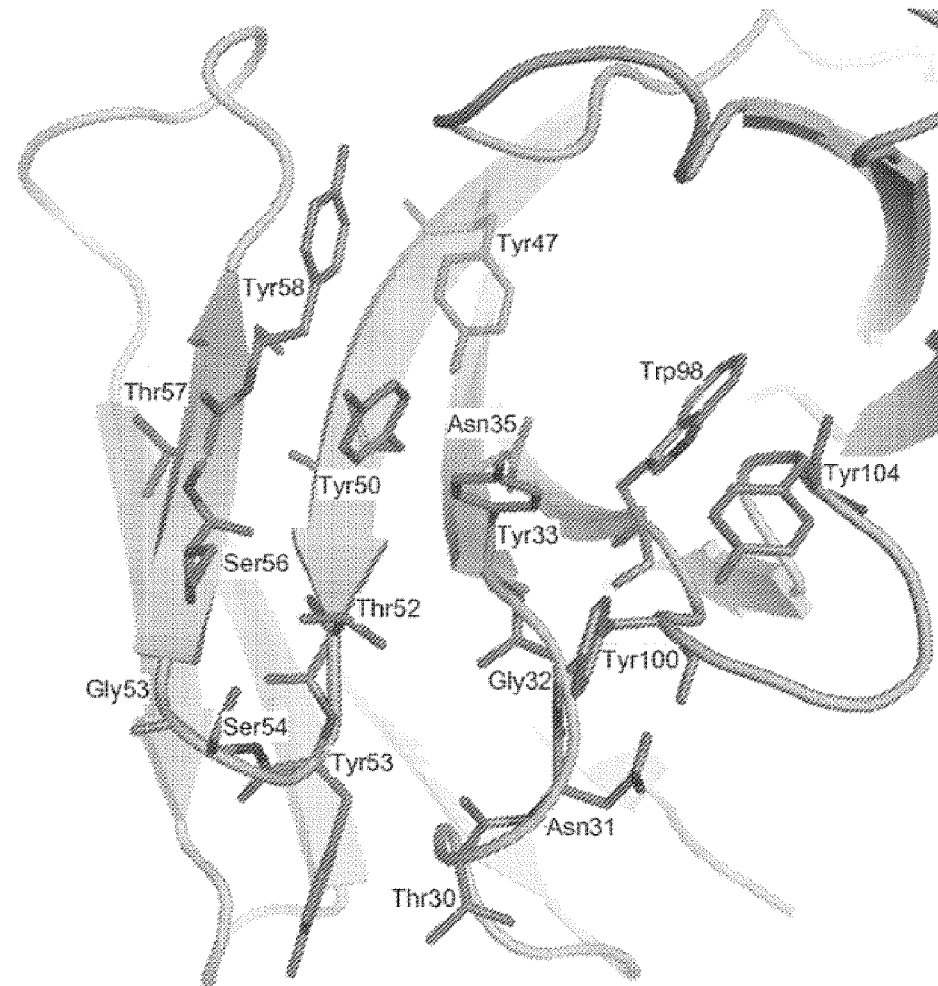


Активный PAI-1 человека

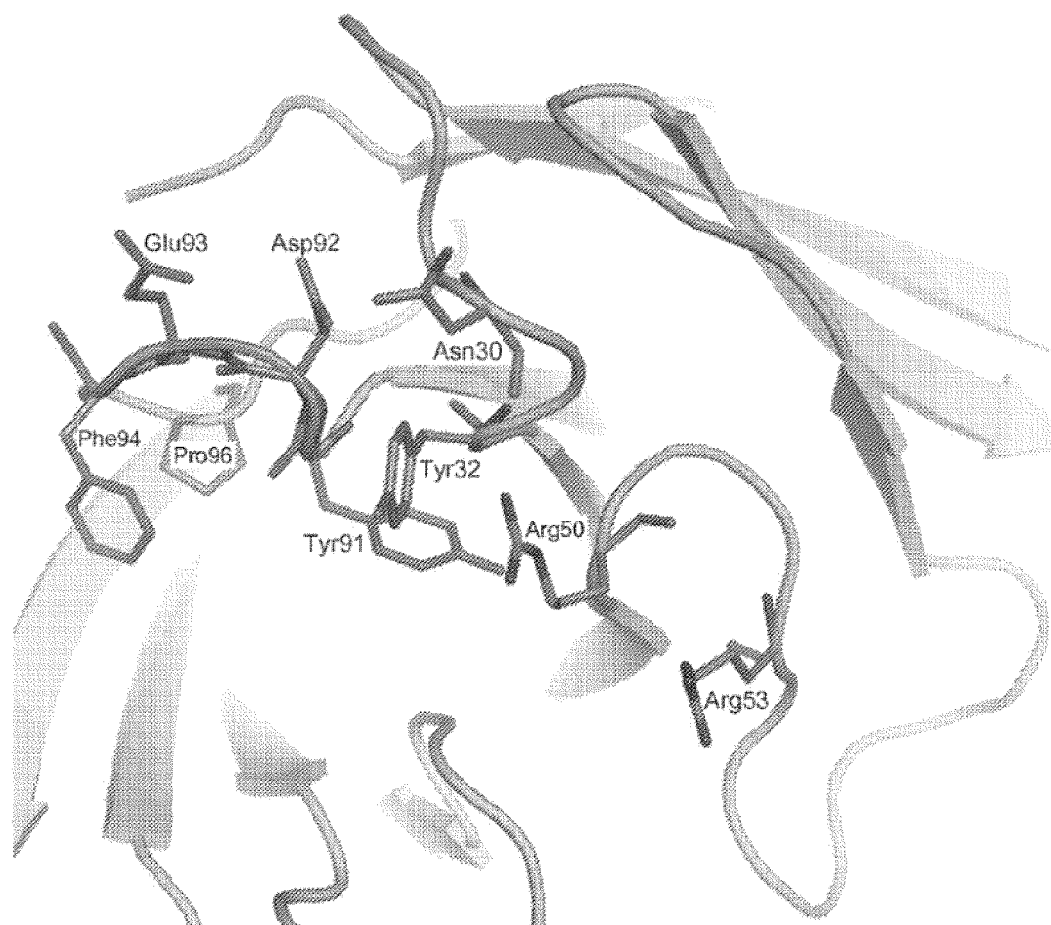


Неактивный PAI-1 макака-крабоеда

ФИГ. 42



ФИГ. 43



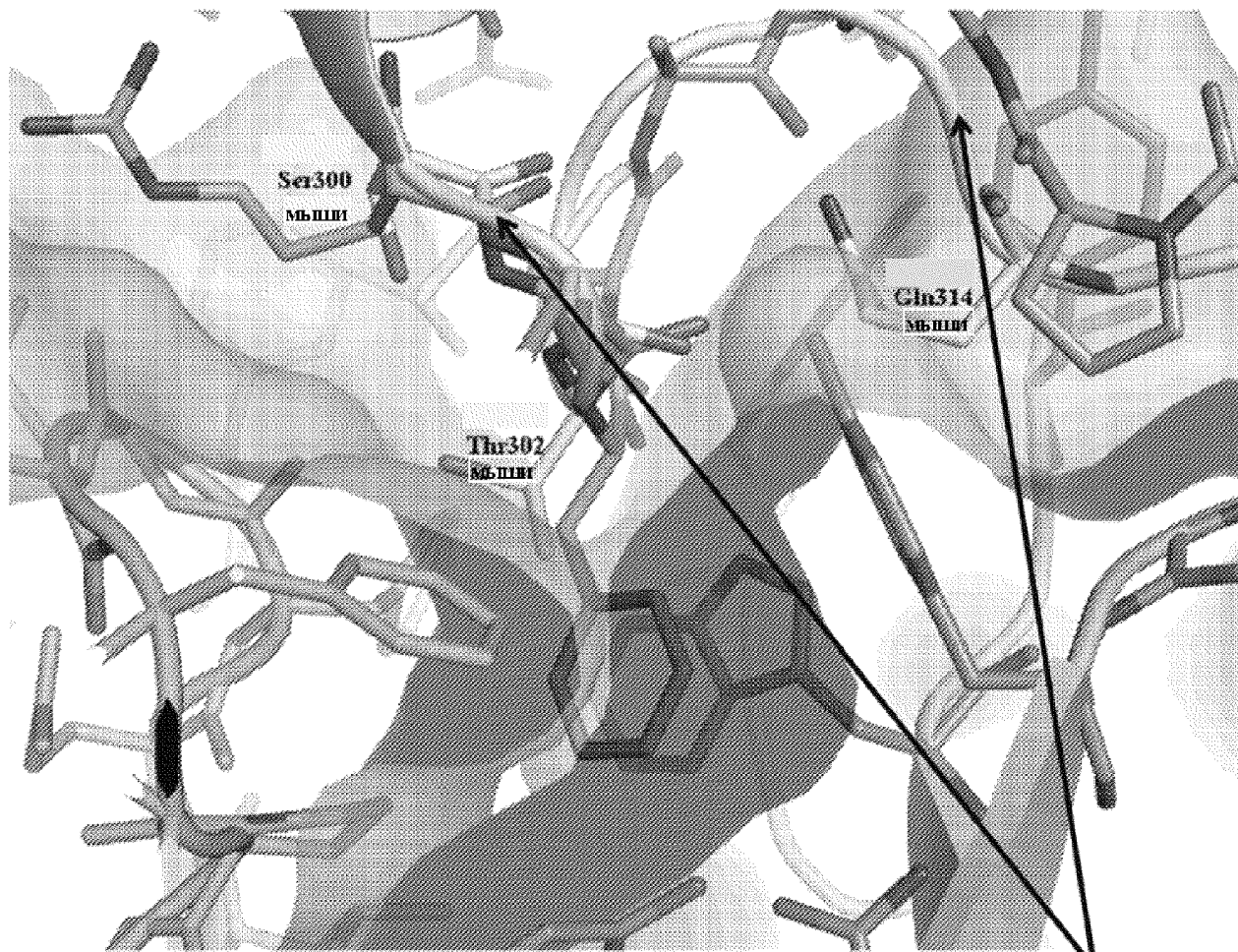
ФИГ. 44

PAI-1 Макака-крабоведа	TTGG E TRQQIQ
PAI-1 Чловека	TTGG E TQQQIQ
PAI-1 Крысы	TTAG K TRQQIQ
PAI-1 Мыши	TTAG K TRRQIQ

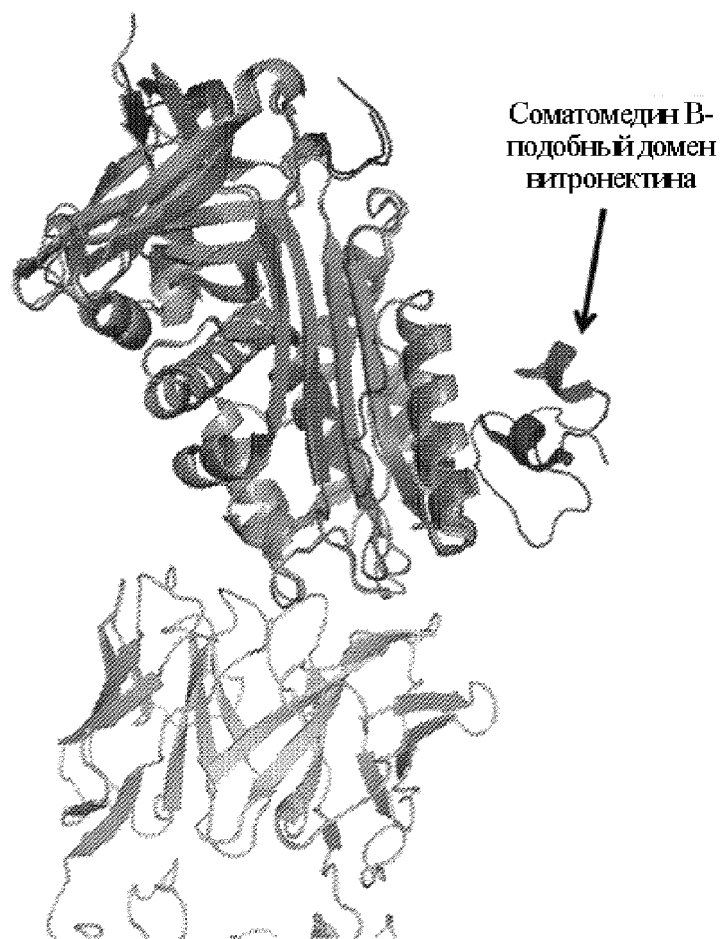
PAI-1 Макака-крабоведа	GAVD Q LTRLVLVNA
PAI-1 Чловека	GAVD Q LTRLVLVNA
PAI-1 Крысы	GAVN E LTRLVLVNA
PAI-1 Мыши	GAVD E LTRLVLVNA

PAI-1 Макака-крабоведа	PLENLGMD MFRQFQADFTSLSNQEPLHVAQALQKV KIE
PAI-1 Чловека	PLENLGMD MFRQFQADFTSLSDQEPLHVALALQKV KIE
PAI-1 Крысы	PLEKLGM TDIFSSTQADFTSLSDQEQLSVAQALQKV KIE
PAI-1 Мыши	PLEKLGM PDMFSATLADFTSLSDQEQLSVAQALQKV RIE

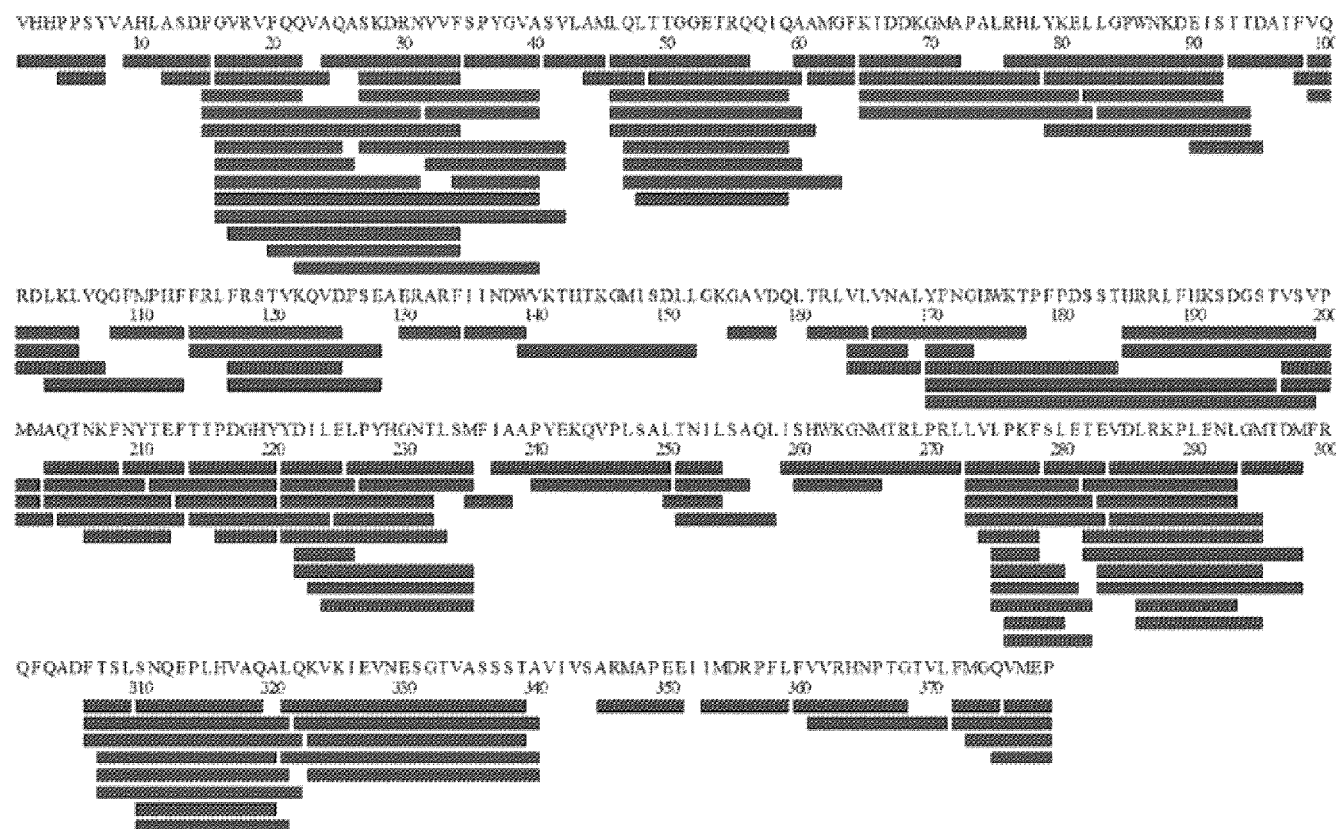
ФИГ. 45



ФИГ. 46

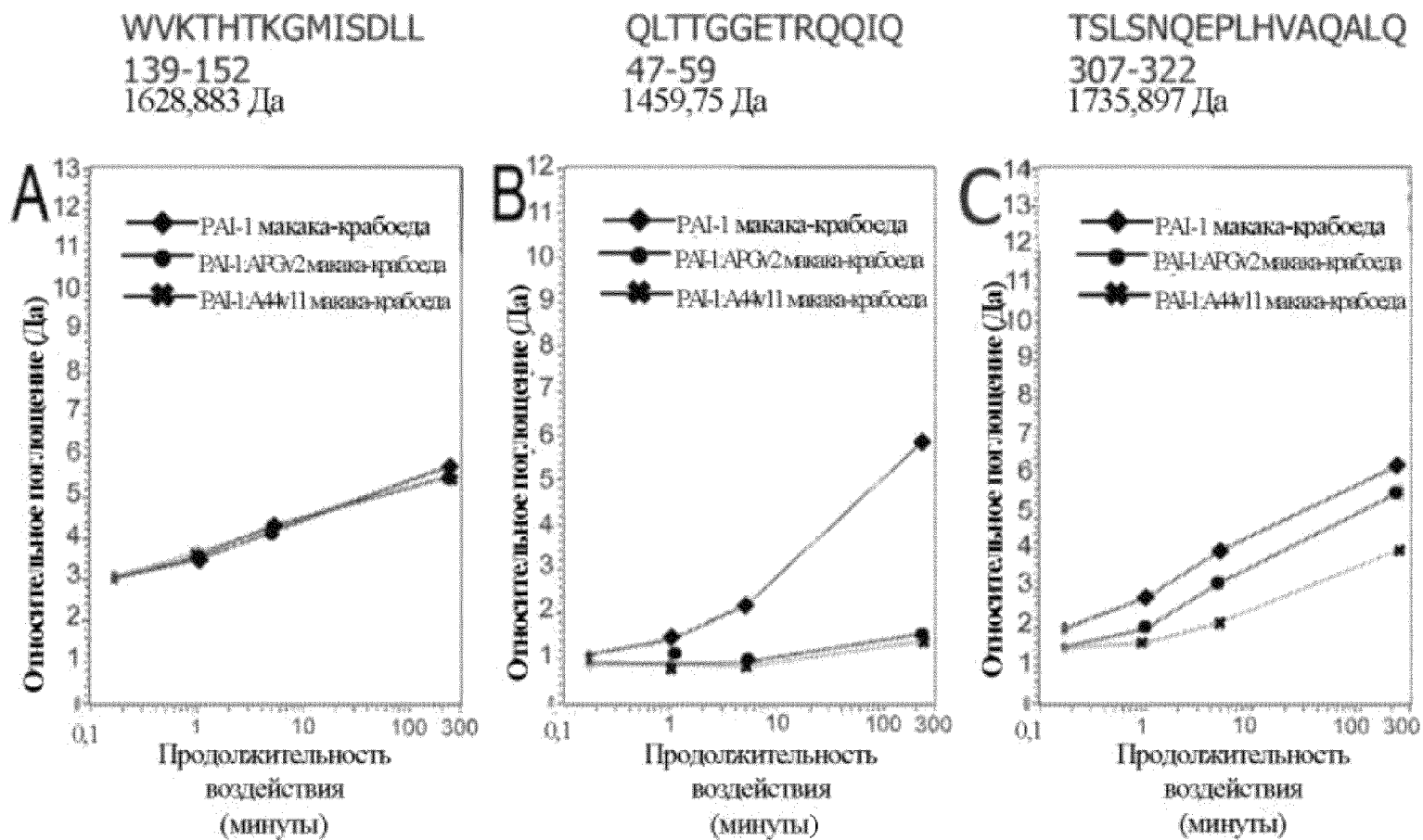


ФИГ. 47

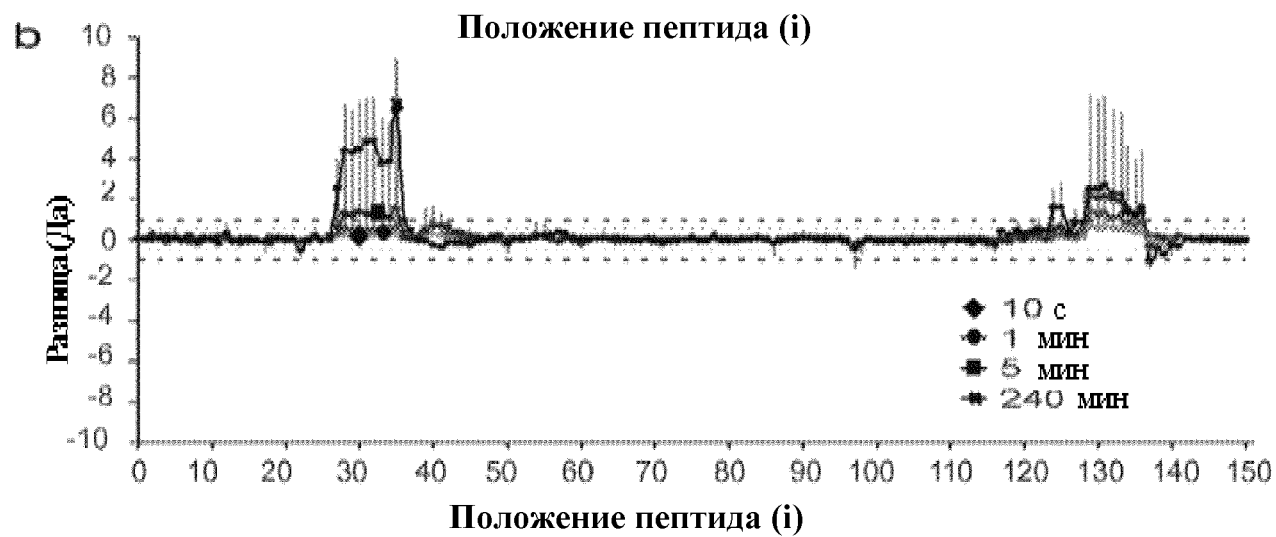
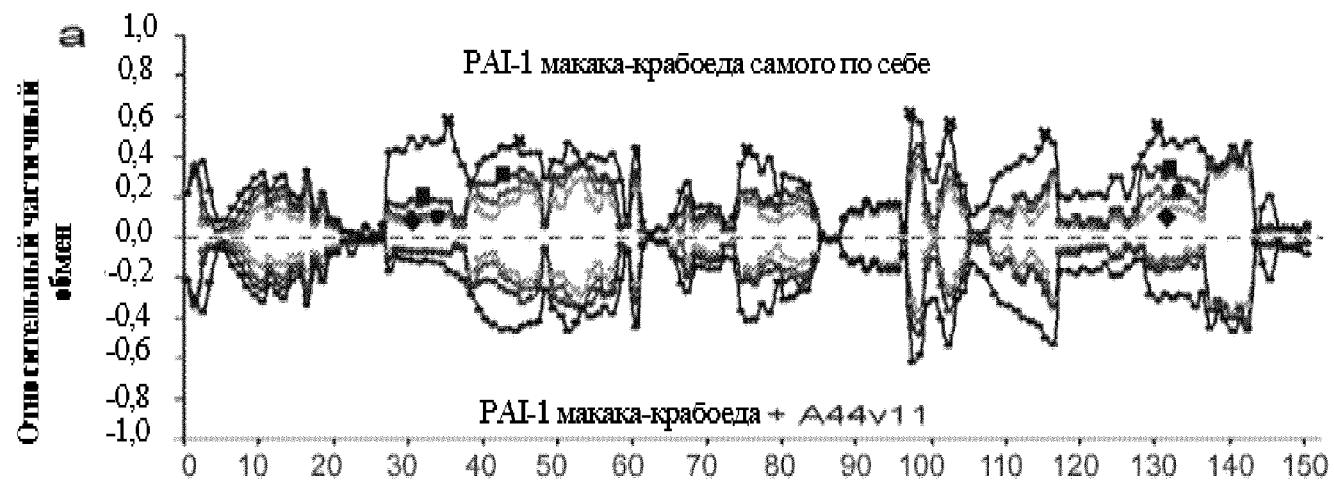


Всего: охват 95,3%
избыток 4,44

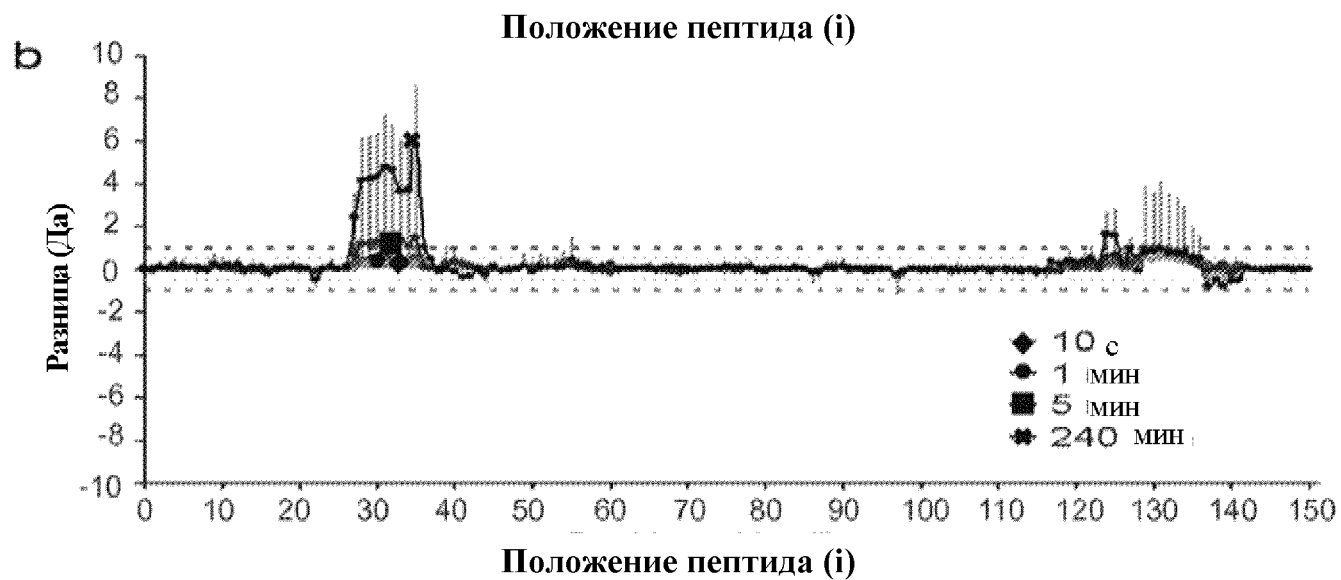
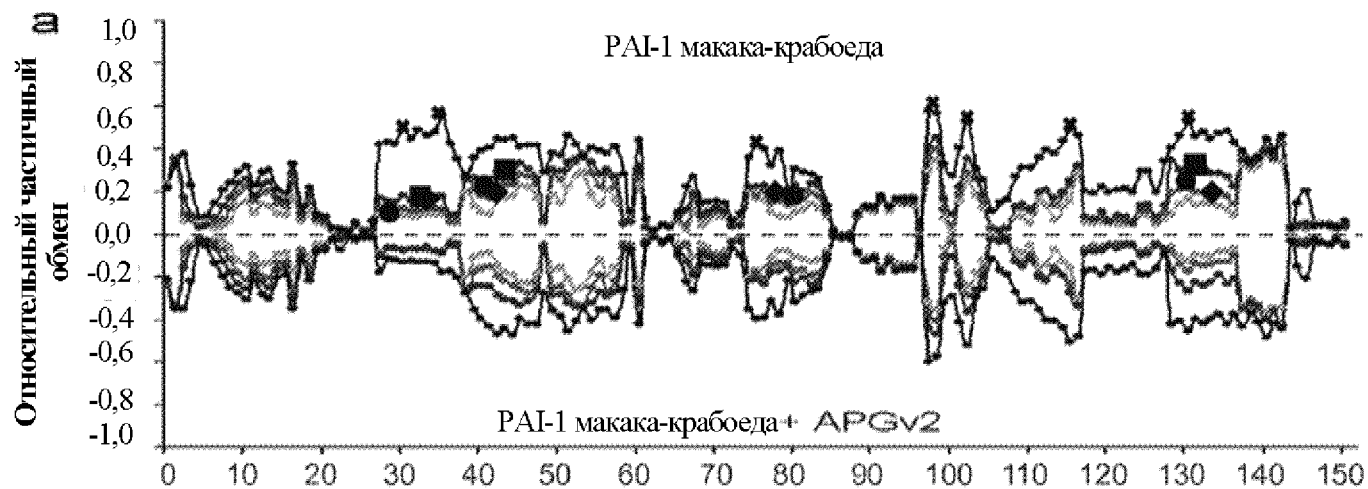
ФИГ. 48



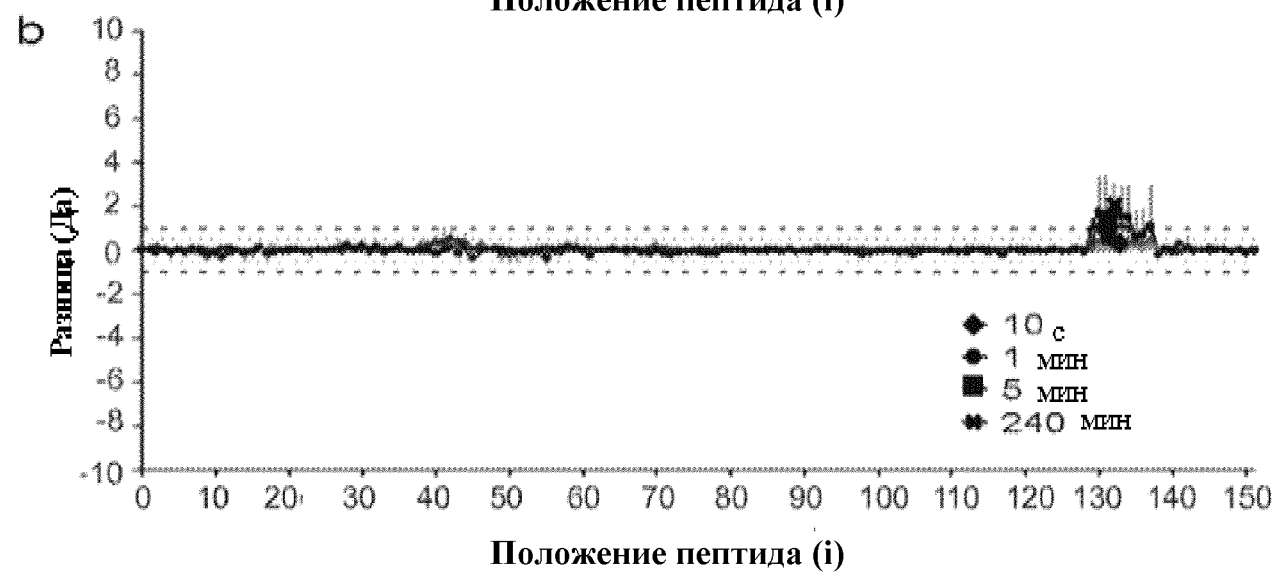
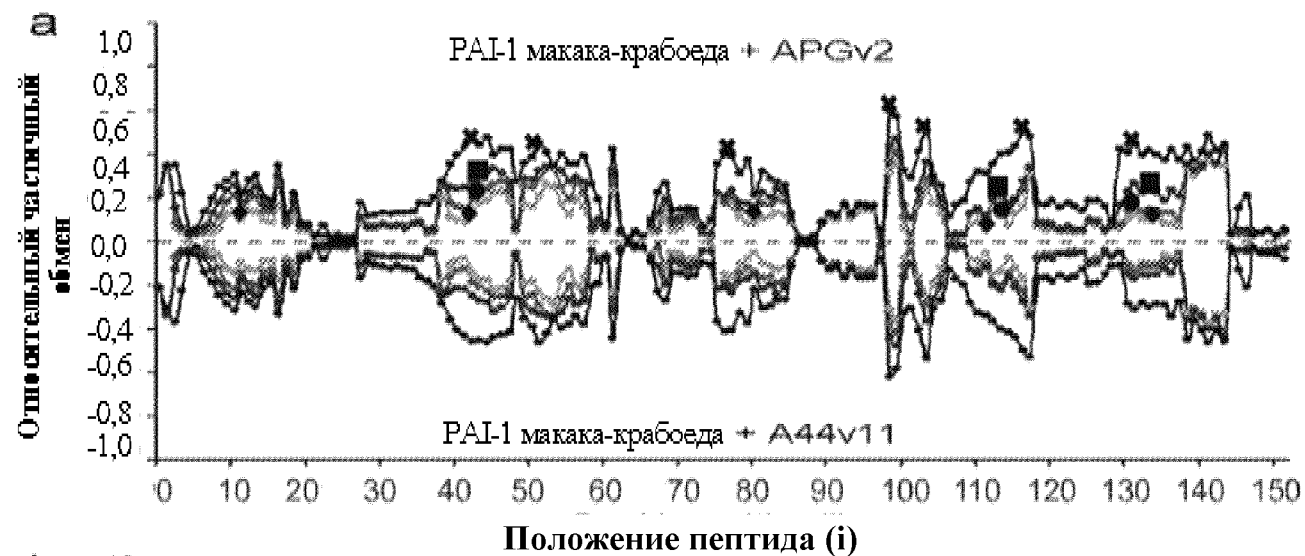
ФИГ. 49



ФИГ. 50



ФИГ. 51



ФИГ. 52

VHHPPSYVAH LASDFGVRVF QQVAQASKDR NVVFSPYGVA SVLAMLQL**TT**
GG**E****TR****Q****Q****I****Q**A AMGFKIDDKG MAPAL**RH**LYK ELLGPWNKDE ISTTDAIFVQ
 RDLKLVQGFM PHFERLFRST VKQVDFSEAE RARFIINDWV KTHTKGMISD
 LLGKGAVD**Q****L** **T****R**LVLVNALY FNGHWKTPFP DSSTHRRLFH KSDGSTVSVP
 MMAQTNKFNY TEFTTPDGHY YDILELPYHG NTLSMFIAAP YEKQVPLSAL
 TNILSAQLIS HWKGNMTRLR RLLVLPKFSL ETEVDLRKPL ENLGM**T****D****M****F****R**
Q**F****Q****A****D****F****T****S****L****S** **N****Q****E****P****L****H****V****A****Q**A LQKVKIEVNE SGTVASSSTA VIVSARMAPE
 EIIMDRPFLF VVRHNPTGTV LFMGQVMEP

ЖИРНЫЙ *** HX MS эпитоп
ПРИФТ ***
*** Рентгеновский эпитоп

ФИГ. 53