

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034655

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.03

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690942

(22) Дата подачи заявки
2014.11.06

(54) АНТИТЕЛА К CCL17

(31) 61/900,596

(56) US-A1-20100278844
WO-A1-2011056997
WO-A3-2009120922

(32) 2013.11.06

(33) US

(43) 2016.09.30

(86) PCT/US2014/064302

(87) WO 2015/069865 2015.05.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Боукай Кен, Дель Векчио Альфред,
Кихо Джон, Лэйси Эйлин (US),
Мюррей Линн (GB), Райан Мэри,
Сантулли-Маротто Сандра, Уилер
Джон, Уайтэйкер Брайан, Тепляков
Алексей (US)

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

(57) Изобретение относится к антителам, специфически связывающимся с CCL17, полинуклеотидам, кодирующим антитела или фрагменты, а также к способам получения и применения указанных продуктов.

034655 B1

034655 B1

034655

B1

Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/900596, поданной 6 ноября 2013 г., содержание которой во всей своей полноте включено в настоящее описание путем ссылки.

Область применения изобретения

Изобретение относится к антителам, специфически связывающимся с CCL17, полинуклеотидам, кодирующим антитела или фрагменты, а также к способам получения и применения указанных продуктов.

Предпосылки создания изобретения

Гомеостатический хемокин, CCL17 (хемокин, регулируемый тимусом и активацией (TARC), хемокиновый (мотива С-С) лиганд 17) является мощным хемоаттрактантом лимфоцитов. CCL17 - это лиганд CCR4, рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR), который, как считается, играет важную роль в функции Т-клеток и хемотаксисе, а также миграции иммунных клеток к участкам воспаления. CCR4 экспрессируется преимущественно на Тn2-лимфоцитах, естественных киллерных клетках и инвариантных естественных киллерных Т-клетках (iNKT).

CCL17 ассоциируют с поражающими разные органы заболеваниями человека, такими как язвенный колит (ЯК), атопический дерматит (АД), идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) и бронхиальная астма (Belperio et al., J. Immunol., 173: 4692-469, 2004; Christophi et al., Inflamm. Bowel Dis. doi: 10.1002/ibd.2295; Inoue et al., Eur. Respir. J., 24: 49-56, 2004; Kakinuma et al., J. Allergy Clin. Immunol., 107: 535-541, 2001; Saeki and Tamaki, J. Dermatol. Sci., 43: 75-84, 2006; Tamaki et al., J. Dermatol., 33: 300-302, 2006). У мышей обнаружена связь CCL17 с различными воспалительными состояниями и инфекциями, такими как хроническое воспаление легких, присутствующее в моделях фиброза и бронхиальной астмы, колита и шистосоматоза, предположительно путем индукции ответов Тn2 посредством рекрутинга иммунных клеток CCR4⁺. Нейтрализация CCL17 способствует устранению последствий заболевания в моделях бронхиальной астмы, индуцированной как *A.fumigatus*, так и овальбумином (OVA), и поражения печени в модели индуцированного *P.acnes* повреждения печени у мышей путем блокирования потока Т-клеток (Carpenter and Hogamoam Infect. Immun., 73:7198-7207, 2005; Heiseke et al., Gastroenterology, 142:335-345; Hogamoam et al., Med. Mycol., 43 Suppl 1, S197-202, 2005; Ismailoglu et al., Therapeutic targeting of CCL17 via the systemic administration of a monoclonal antibody ameliorates experimental fungal asthma. Исследование, представленное в Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2011; Jakubzick et al., Am. J. Pathol., 165:1211-122, 2004; Kawasaki et al., J. Immunol., 166:2055-2062, 2001; Yoneyama et al., J. Clin. Invest., 102:1933-1941, 1998).

CCL22 (происходящий из макрофагов хемокин, MDC) является вторым лигандом для CCR4. Взаимодействие CCR4 с каждым хемокином дает отчетливые результаты (Allen et al., Annu. Rev. Immunol. 25:787-820, 2007; Imai et al., J. Biol. Chem. 273:1764-1768, 1998), которые, возможно, дополняются различиями в аффинности связывания двух лигандов для CCR4. CCL22 связывается с CCR4 с большей аффинностью и индуцирует интернализацию рецептора с большей легкостью, чем CCL17 (Baatar et al., J. Immunol. 179:1996-2004, 2007; Imai et al., J. Biol. Chem. 273:1764-1768, 1998; Mariani et al., Eur. J. Immunol. 34:231-240, 2004), и стимулирует клеточную адгезию с большей легкостью, чем CCL17 (D'Am-brosio et al., J. Immunol. 169:2303-2312, 2002). CCL22 демонстрирует более ограниченную экспрессию с продукцией, ограниченной иммунными клетками, тогда как CCL17 экспрессируется и секретируется многими разными типами клеток, включая неиммунные клетки (Alferink et al., J. Exp. Med. 197:585-599, 2003; Berin et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 24:382-389, 2001; Godiska et al., J. Exp. Med. 185:1595-1604, 1997; Imai et al., J. Biol. Chem. 271:21514-21521, 1996; Saeki and Tamaki, J. Dermatol. Sci. 43:75-84, 2006). В модели экспериментального сепсиса с лигированием и пункцией слепой кишки (CLP) у мышей CCL22 активизировал врожденный иммунитет, тогда как CCL17, по видимому, вызывал повреждение органов и в некоторых условиях способствовал ему (Matsukawa et al., Rev. Immunogenet. 2:339-358, 2000). В модели инвазивного аспергиллеза легких у мышей CCL22 выполнял защитную роль во врожденном противогрибковом ответе, тогда как CCL17 выполнял роль супрессора (Carpenter and Hogaboam, Infect. Immun. 73:7198-7207, 2005). Эти два хемокина могут играть противоположные роли в развитии локализованного воспаления вследствие различающегося влияния на гомеостаз Treg в том отношении, что рекрутирование Treg является предпочтительным для CCL22, но не для CCL17 (Heiseke et al., Gastroenterology 142:335-345, 2011; Montane et al., J. Clin. Invest., 121:3024-30, 2011; Weber et al., J. Clin. Invest. 121:2898-2910, 2011).

В модели контактной гиперчувствительности у животных CCL17 является основным фактором в инициации воспалительного ответа, стимулирующим контактную гиперчувствительность (CHS) провокационной пробой с флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ) либо с динитрофторбензолом (DNFB), и нокаут CCL17 у этих мышей улучшал выживаемость сердечных аллогенных трансплантатов по сравнению с гетерозиготными мышами, имеющими одну функциональную аллель CCL17 (Alferink et al., J. Exp. Med. 197:585-599, 2003).

Антагонисты CCR4 могут быть неселективными и ингибировать функции как CCL17, так и CCL22. Таким образом, существует потребность в антителах к CCL17 для потенциального лечения различных заболеваний, опосредованных CCL17, включая бронхиальную астму.

Изложение сущности изобретения

Один вариант осуществления изобретения является выделенным антителом, специфически связыва-

вающим человеческий CCL17, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем антитело конкурирует за связывание человеческого CCL17 с антителом, содержащим VH с SEQ ID NO:45 и VL с SEQ ID NO: 52.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17, содержащее последовательность SEQ ID NO: 1, причем антитело связывается с человеческим CCL17, по меньшей мере, в пределах аминокислотных остатков 21-23, 44-45 и 60-68 CCL17.

Другой вариант осуществления изобретения является выделенным антителом, специфически связывающим человеческий CCL17, причем антитело связывается с человеческим CCL17 с константой аффинности (K_D) около 1×10^{-10} М или менее при измерении K_D с использованием равновесной аффинности в растворе в солевом буфере на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, после совместной инкубации антитела и человеческого CCL17 на протяжении 48 ч при 4°C.

Другой вариант осуществления изобретения является выделенным антителом, специфически связывающимся с человеческим CCL17, содержащим определенные последовательности CDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3.

Другой вариант осуществления изобретения является выделенным антителом, специфически связывающимся с человеческим CCL17, содержащим определенные последовательности VH и VL.

Другой вариант осуществления изобретения является выделенным антителом, специфически связывающимся с человеческим CCL17, причем антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную VH с SEQ ID NO: 46, и VL, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную VL с SEQ ID NO: 62.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую антитело настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Другой вариант изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий VH или VL настоящего изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в способе продуцирования антител, включающем культивирование предложенных в настоящем изобретении клеток-хозяев в условиях, в которых продуцируется антитело.

Другой вариант осуществления изобретения является способом лечения CCL17-опосредованного заболевания, включающим в себя введение антитела изобретения нуждающемуся в таком лечении субъекту в течение времени, достаточного для лечения CCL17-опосредованного заболевания.

Другой вариант осуществления изобретения является способом лечения бронхиальной астмы или гиперреактивности дыхательных путей, включающим в себя введение антитела изобретения субъекту в течение времени, достаточного для лечения бронхиальной астмы.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A показано ингибирование хемотаксиса антителом B302 к CCL17, индуцированным 1 нМ человеческого CCL17 в клетках CCRF-CEM. B302 представляет собой C17B302;

на фиг. 1B - ингибирование хемотаксиса антителом B311 к CCL17, индуцированным 1 нМ человеческого CCL17 в клетках CCRF-CEM. B311 представляет собой C17B311;

на фиг. 1C - эффект контроля изотипа IgG2 на хемотаксис, индуцированный 1 нМ человеческого CCL17 в клетках CCRF-CEM;

на фиг. 1D - эффект контроля изотипа IgG4 на хемотаксис, индуцированный 1 нМ человеческого CCL17 в клетках CCRF-CEM;

на фиг. 2A - ингибирование хемотаксиса антителом B302 к CCL17, индуцированным 1 нМ CCL17 яванского макака в звездчатых клетках печени линии F (HSC-F). B302 представляет собой C17B302;

на фиг. 2B - ингибирование хемотаксиса антителом B311 к CCL17, индуцированным 1 нМ CCL17 яванского макака в звездчатых клетках печени линии F (HSC-F). B311 представляет собой C17B311;

на фиг. 2C - эффект контроля изотипа IgG2 на хемотаксис, индуцированный 1 нМ CCL17 яванского макака в клетках HSC-F;

на фиг. 2D - эффект контроля изотипа IgG4 на хемотаксис, индуцированный 1 нМ CCL17 яванского макака в клетках HSC-F;

на фиг. 3 - последовательности VH антител к CCL17, связывающихся с человеческим CCL17 с K_D 100 нМ или ниже;

на фиг. 4 - консенсусные последовательности VH и областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR), антител к CCL17, показанных на фиг. 3, которые связываются с человеческим CCL17 с K_D 100 нМ или ниже;

на фиг. 5 - последовательности VH антител к CCL17, связывающихся с человеческим CCL17 с K_D

100 нМ или ниже;

на фиг. 6А - консенсусная последовательность VL антител к CCL17, показанных на фиг. 5, которые связываются с человеческим CCL17 с K_D 100 нМ или ниже;

на фиг. 6В - консенсусные последовательности областей, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR), антител к CCL17, показанных на фиг. 5, которые связываются с человеческим CCL17 с K_D 100 нМ или ниже;

на фиг. 7 - остатки эпитопа и паратопа антитела C17B236. Остатки паратопа VH и VL заключены в рамку и остатки эпитопа CCL17 обведены кружком. Нумерация остатков в соответствии с SEQ ID NO: 45 (VH), SEQ ID NO: 52 (VL), SEQ ID NO: 1 (CCL17).

Подробное описание изобретения

Все публикации, упоминаемые в данном описании, включая, без ограничений, патенты и патентные заявки, включенные путем ссылок, являются частью настоящего документа, как если бы они были изложены непосредственно в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не являются ограничивающими. Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой имеет отношение настоящее изобретение.

В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя для анализа настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут использоваться следующие термины.

При использовании в настоящем документе термины "специфическое связывание" или "специфически связывается" или "связывается" относятся к антителу, проявляющему большую аффинность при связывании с заданным антигеном по сравнению с другими антигенами. Как правило, связывание антитела с заданным антигеном характеризуется константой диссоциации (K_D) около 1×10^{-7} М или менее, например, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, около 1×10^{-13} М или около 1×10^{-14} или менее, как правило, при K_D , являющейся по меньшей мере в десять раз меньше K_D связывания с неспецифическим антигеном или эпитопом (например, BSA, казеином). Константу диссоциации можно измерить стандартными способами. Однако антитела, специфически связывающиеся с заданным антигеном, могут иметь перекрестную реактивность к другим родственным антигенам, например, к такому же заданному антигену от других биологических видов (гомологов), например человека или обезьяны, например *Macaca fascicularis* (яванского макака) или *Pan troglodytes* (шимпанзе).

"Моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим CCL17", относится к антителам, которые специфически связываются со зрелым человеческим CCL17, имеющим последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1.

При использовании в настоящем документе термины "нейтрализующий" или "нейтрализует" и "нейтрализующее антитело" или "антагонист антитела" относятся к антителу или фрагменту антитела, которое частично или полностью ингибирует при помощи любого механизма биологическую активность CCL17. Нейтрализующие антитела можно выявлять с использованием анализов биологической активности CCL17, описанных ниже. Нейтрализующие CCL17 антитела могут ингибировать измеренную биологическую активность CCL17 на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Термины "человеческий CCL17" или "huCCL17", используемые в настоящем документе как синонимы, относятся к белку человеческого CCL17, имеющему аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1. Последовательность полноразмерного CCL17, включающая сигнальную последовательность, доступна в GenBank; номер доступа NP_002978.

Термины "CCL17 яванского макака" или "cCCL17", используемые в настоящем документе как синонимы, относятся к белку CCL17 *Macaca fascicularis* (яванского макака), имеющему аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2.

При использовании в настоящем документе термин "антитела" подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулина, включающие моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные антитела, фрагменты антител, биспецифические и мультиспецифические антитела, образованные из по меньшей мере двух интактных антител или фрагментов антител, димерные, тетрамерные и мультимерные антитела, одноцепочечные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена требуемой специфичности.

Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изотипы IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ)

и лямбда (λ), в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термин "фрагменты антитела" означает часть молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий сайт тяжелой цепи и/или легкой цепи, например, определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, вариабельную область тяжелой цепи (VH) или вариабельную область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают фрагмент Fab - моновалентный фрагмент, состоящий из VL или VH; F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы методами инженерии и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конструкций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессированы в отдельных одноцепочечных конструктах антител, с образованием одновалентного антигенсвязывающего сайта, например, одноцепочечного Fv (scFv) или диатела; они описаны, например, в международной патентной публикации WO 1998/01649; международной патентной публикации WO 1994/13804; международной патентной публикации WO 1992/01047. Эти фрагменты антител получают с использованием хорошо известных методов, и фрагменты антител характеризуют таким же образом, что и интактные антитела.

Фраза "выделенное антитело" означает антитело, по существу, не содержащее других антител, имеющих разные значения антигенной специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17, по существу, не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от человеческого CCL17). Однако выделенное антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как ортологи человеческого CCL17, например CCL17 *Macaca fascicularis* (яванского макака). Более того, выделенное антитело может, по существу, не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Вариабельная область антитела состоит из "каркасного" участка, разделенного тремя "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определены с использованием различных терминов: (i) области, определяющие комплементарность (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat, J. Exp. Med. 132:211-50, 1970; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); (ii) "гипервариабельные области", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям вариабельных доменов антитела, являющихся по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-17, 1987). К другим терминам относятся IMGT-CDR (Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003) и "используемые остатки, определяющие специфичность" (SDRU) (Almagro Mol. Recognit. 17:132-43, 2004). В базе данных International ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлена стандартизованная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между границами CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003.

"Остатки по Chothia" в настоящем документе представляют собой остатки антитела VL и VH с нумерацией в соответствии с Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-48, 1997).

"Каркас" или "каркасные последовательности" представляют собой оставшиеся последовательности вариабельной области, которые отличны от определяющего антигенсвязывающего сайта. Поскольку для определения антигенсвязывающего сайта могут использоваться разные термины, как описано выше, определение точной аминокислотной последовательности каркасного участка зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

"Гуманизированное антитело" означает антитело, в котором антигенсвязывающий сайт получен из видов, отличных от человека, а каркасы вариабельной области получены из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела могут включать замены в каркасных областях, в результате чего каркас может не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или зародышевых генных последовательностей.

Термин "человеческое антитело" означает антитело, имеющее вариабельные области тяжелой и легкой цепи, в которых как каркасные области, так и области антигенсвязывающего сайта получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область, то константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепи, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области антитела получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перераспределенные гены иммуноглобулина. К таким системам относятся библиотеки генов, например библиотеки человеческих иммуноглобулинов на фаговом дисплее и трансгенные животные, отличные от

человека, например мыши, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. "Человеческое антитело" может содержать аминокислотные отличия по сравнению с человеческой зародышевой линией или перераспределенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным введением замен. Как правило, "человеческое антитело" по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческой зародышевой линии или перераспределенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях "человеческое антитело" может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000), или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов на фаговом дисплее, например, как описано в публикации Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации WO 2009/08546.

Выделенные гуманизированные антитела могут быть синтетическими. Человеческие антитела, хотя и полученные из последовательностей человеческого иммуноглобулина, могут быть созданы с использованием таких систем, как фаговый дисплей, включающий синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антитела, что приведет к получению антител, в естественных условиях не входящих в репертуар человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Человеческие антитела могут включать замены в каркасе или сайте связывания антигена, так что они могут не быть точными копиями экспрессируемого человеческого иммуноглобулина или зародышевых линий генных последовательностей. Однако антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение "человеческих антител".

При использовании в настоящем документе термин "рекомбинантное антитело" включает в себя все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, например антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или из полученной из него гибридомы (дополнительно описана ниже), антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые включают сплайсинг генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

При использовании в настоящем документе термин "моноклональное антитело" означает препарат молекул антитела одномолекулярной композиции.

При использовании в настоящем документе термин "по существу, идентичный" означает, что аминокислотные последовательности двух сравниваемых вариативных областей антител идентичны или имеют "несущественные отличия". Несущественные отличия представляют собой замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в последовательности вариативной области антитела, не оказывающие отрицательного воздействия на свойства антитела. Аминокислотные последовательности, по существу, идентичные последовательностям вариативных областей, описанных в настоящем документе, находятся в пределах объема настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или выше. Процентное значение идентичности можно определить, например, путем попарного выравнивания с использованием настроек по умолчанию для модуля AlignX в Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Белковые последовательности настоящего изобретения можно использовать в качестве искомой последовательности при выполнении поиска в общедоступных или патентованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, использующихся для осуществления такого поиска, являются XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), либо GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Уэстборо, штат Массачусетс, США) - пакет с настройками "по умолчанию".

Термин "эпитоп" в настоящем документе означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (например, полярных, неполярных или гидрофобных) поверхностных группировок остатков, например боковых цепей аминокислот или полисахаридов, и они могут иметь специфические особенности трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационный пространственный блок. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в трехмерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

При использовании в настоящем документе термин "биспецифический" относится к антителу или молекуле, которое(ая) связывает два разных антигена или два разных эпитопа одного антигена.

При использовании в настоящем документе термин "моноспецифический" относится к антителу, связывающему один антиген или один эпитоп.

При использовании в настоящем документе термин "в комбинации с" означает, что описанные агенты можно вводить животному совместно в смеси, одновременно в качестве отдельных агентов или

последовательно в качестве отдельных агентов в любом порядке.

Термин "вектор" означает полинуклеотид неприродного происхождения, способный к воспроизведению внутри биологической системы, или который можно переместить между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат кДНК, кодирующую интересующий белок, и дополнительные элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, способствующие удвоению или сохранению данных полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин "вектор экспрессии" означает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для прямой трансляции полипептида, закодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в векторе экспрессии.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечные и одноцепочечные молекулы ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

Термин "комплементарная ДНК" или "кДНК" обозначает известный синтетический полинуклеотид, имеющий такое же расположение элементов последовательности, как и в нативных зрелых разновидностях мРНК, со смежными экзонами и с удаленными вставляющимися интронами, присутствующими в геномной ДНК. Кодированные инициаторный метионин кодоны могут присутствовать или отсутствовать в кДНК. кДНК может синтезироваться, например, посредством обратной транскрипции или сборки синтетического гена.

При использовании в настоящем документе термин "синтетический" или "неприродного происхождения" относится к полинуклеотидной или полипептидной молекуле, не присутствующей в природе.

Понятие "полипептид" или "белок" обозначает молекулу, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться "пептидами".

В изобретении использованы общепринятые одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутамин	Gln	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Композиции изобретения.

В изобретении предложены моноклональные антитела, специфически связывающиеся с человеческим CCL17. Антитела изобретения ингибируют биологическую активность CCL17 в клетке и могут необязательно перекрестно реагировать с CCL17 яванского макака. В настоящем изобретении предложены синтетические полинуклеотиды, кодирующие антитела и их фрагменты, векторы и клетки-хозяева, и способы создания и применения антител изобретения.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, является выделенным антителом, специфически связывающимся с человеческим CCL17, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем антитело конкурирует за связывание с человеческим CCL17 с антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 52.

Конкуренцию за специфическое связывание с человеческим CCL17 между антителами изобретения, содержащими определенные аминокислотные последовательности VH и VL, можно проанализировать *in vitro* с использованием хорошо известных способов. Например, связывание меченых сложным эфиром NHS MSD Sulfo-Tag™ антител с человеческим CCL17 в присутствии немеченых антител можно анализировать с помощью анализов ИФА или Biacore, или для демонстрации конкуренции с антителами настоящего изобретения можно использовать проточную цитометрию. Способность испытуемого антитела ингибировать связывание антитела, содержащего VH с последовательностью SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 52 с человеческим CCL17 демонстрирует, что тестовое антитело может конкурировать с этими антителами за связывание с человеческим CCL17.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1, причем антитело связывается с человеческим CCL17, по меньшей мере, в пределах аминокислотных остатков 21-23, 44-45 и 60-68 CCL17. Выражение "по меньшей мере, в пределах аминокислотных остатков 21-23, 44-45 и 60-68 человеческого CCL17" означает, что антитело к CCL17 связывается по меньшей мере с одним остатком, находящимся в пределах аминокислотного отрезка остатков 21-23 с SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере с одним остатком, находящимся в пределах аминокислотного отрезка остатков 44-45 с SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере с одним остатком, находящимся в пределах аминокислотного отрезка остатков 60-68 с SEQ ID NO: 1. Антитело может связываться с более чем одним остатком в пределах остатков 21-23, 44-45 и 60-68 и дополнительными остатками за пределами остатков 21-23, 44-45 и 60-68 с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, антитело связывается с человеческим CCL17, по меньшей мере, по остаткам R22 и K23 последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело связывается с человеческим CCL17, по меньшей мере, по остаткам L21, R22, K23, V44, Q45, N60, Y64, S67 и L68 с SEQ ID NO: 1.

Пример антитела, которое связывается с человеческим CCL17 в пределах аминокислотных остатков CCL17 21-23, 44-45 и 60-68 с SEQ ID NO: 1, представляет собой C17B236, имеющий VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 52. На основании анализов кристаллической структуры основные остатки эпитопа, связанные C17B236, - это R22 и K23 из CCL17 с SEQ ID NO: 1, на основании числа контактов между этими остатками и остатками VH антитела.

Другие примеры антител, которые связываются с человеческим CCL17 в пределах аминокислотных остатков 21-23, 44-45 и 60-68 CCL17, - это варианты C17B236 с созревшей аффинностью, от которых все антитела получены в процессе аффинного созревания одного и того же исходного антитела. Последовательности VH и VL примеров антител показаны на фиг. 3 и 5. Созревание аффинности антител обычно вовлекает аминокислотные замены в областях, определяющих комплементарность (CDR), или в зоне Верньера (области каркаса, которые находятся под CDR). Созревшие варианты выбраны путем пэннинга комбинационных библиотек, которые могут содержать до 10^8 мутантов. Если в каждом положении допустимы все 20 аминокислот, то кеп на размере библиотеки ограничивает число вариабельных позиций до 6-7. Большинство остатков паратопа сохранены в каждой комбинационной библиотеке, что также обеспечивает сохранение связывающего эпитопа. Несколько кристаллографических исследований исходного и созревшего антител продемонстрировали, что эпитоп всегда сохраняется в процессе созревания аффинности (например, Fransson et al., J. Mol. Biol. 2010; 398:214-231; Gustchina et al., PLoS Pathog. 2010; 6:e1001182; La Porte et al., MAbs 2014; 6:1059-1068).

Антитела к CCL17, которые связываются с человеческим CCL17 в пределах аминокислотных остатков 21-23, 44-45 и 60-68 CCL17, связываются с человеческим CCL17 с высокой аффинностью, обычно с K_D менее чем около 1×10^{-10} М.

Антитела, которые связываются с человеческим CCL17 в пределах аминокислотных остатков 21-23, 44-45 и 60-68 CCL17, могут быть получены, например, путем иммунизации мышей химерным белком CCL17, который имеет последовательности человеческого CCL17 в положениях остатков 21-23, 44-45 и

60-68, или пэннинга библиотек фагового дисплея человеческим CCL17 дикого типа и перекрестного скрининга полученных совпадений с вариантами CCL17, которые имеют заместители в каждом или нескольких положениях остатков в пределах остатков 21-23, 44-45 и 60-68 человеческого CCL17, с использованием способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17, блокирует взаимодействие CCL17/CCR4.

Антитела можно тестировать на их способность блокировать взаимодействие CCL17/CCR4 с помощью стандартной проточной цитометрии. Например, экспрессирующие CCR4 клетки инкубируют с флуоресцентно меченым человеческим CCL17 и тестовым антителом, после чего оценивают связь флуоресцентно меченого человеческого CCL17 на поверхности экспрессирующих CCR4 клеток с использованием стандартных способов. Антитела, которые "блокируют взаимодействие CCL17/CCR4" или "ингибируют взаимодействие CCL17/CCR4", могут ингибировать связывание CCL17 с экспрессирующими CCR4 клетками на 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% в сравнении со связыванием CCL17 в отсутствие антитела.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, является выделенным антителом, специфически связывающимся с человеческим CCL17, причем антитело связывается с человеческим CCL17 с константой (K_D) аффинности около 1×10^{-7} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-12} М или менее, около 1×10^{-13} М или менее или около 1×10^{-14} М или менее при измерении K_D с использованием равновесной аффинности в растворе в солевом буфере на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, после совместной инкубации антитела и человеческого CCL17 на протяжении 48 ч при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело связывается с человеческим CCL17 с константой (K_D) аффинности около 1×10^{-10} М или менее при измерении K_D с использованием равновесной аффинности в растворе в солевом буфере на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, после совместной инкубации антитела и человеческого CCL17 на протяжении 48 ч при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело связывается с человеческим CCL17 с K_D около 5×10^{-12} М или менее.

В другом варианте осуществления, описанном в настоящем документе, антитело изобретения, специфически связывающееся с человеческим CCL17, связывается с CCL17 *Macaca fascicularis* (яванского макака) с константой (K_D) аффинности, составляющей около 1×10^{-6} М или менее, около 1×10^{-7} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-12} М или менее при измерении K_D с использованием равновесной аффинности в растворе в солевом буфере на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, после совместной инкубации антитела и CCL17 яванского макака на протяжении 48 ч при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело изобретения связывается с CCL17 *Macaca fascicularis* (яванского макака) с K_D около 1×10^{-8} М или менее при измерении K_D с использованием равновесной аффинности в растворе в солевом буфере на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, после совместной инкубации антитела и CCL17 яванского макака на протяжении 48 ч при 4°C.

Аффинность антитела к человеческому CCL17, имеющему последовательность с SEQ ID NO: 1, или CCL17 яванской макаки, имеющему последовательность SEQ ID NO: 2, можно измерить экспериментально с использованием любого подходящего способа. Такие способы могут использовать оборудование Proteon, Biacore или KinExA, такое как ProteOn XPR36 или Biacore 3000, анализ равновесной аффинности в растворе (SEA), ИФА или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Примеры способов описаны в примере 3. Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре антитело/CCL17 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH, буфер, концентрация моющего средства). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D , K_{on} , K_{off}) предпочтительно осуществлять с использованием стандартизированных условий и стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалисту в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерения аффинности, например, с использованием равновесной аффинности в растворе, Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин "приблизительно" отражает типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное CO для K_D 1×10^{-9} М составляет до $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ М.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17, причем антитело ингибирует биологическую активность CCL17.

При использовании в настоящем изобретении термин "биологическая активность CCL17" относится к любой активности, возникающей в результате связывания CCL17 с его рецептором CCR4. Пример биологической активности CCL17 приводит к внутриклеточной мобилизации кальция или хемотаксису кле-

ток, например клеток CCRF-CEM (линия Т-лимфобластоидных клеток от пациента с острым лейкозом). Антитела изобретения можно тестировать на их способность ингибировать биологическую активность CCL17 с использованием стандартных способов и способов, описанных в настоящем документе. Например, способность антител изобретения ингибировать CCL17-зависимую внутриклеточную мобилизацию кальция можно анализировать, измеряя эффект антител на CCL17-зависимую внутриклеточную мобилизацию кальция с использованием флуоресцентных красителей, таких как Fluo-8 NW, Fluo-4 AM или Fluo-3 AM. Способность антител изобретения ингибировать CCL17-зависимый хемотаксис можно определить измерением миграции клеток CCRF-CEM через полупроницаемый 5 мкМ фильтр в двухкамерной системе культур и измерением жизнеспособности клеток, мигрировавших через фильтр; антитела изобретения могут ингибировать биологическую активность CCL17 на около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, является антителом, специфически связывающимся с CCL17, причем антитело ингибирует индуцированную 10 нг/мл человеческого CCL17 мобилизацию кальция в клетках CCRF-CEM, измеренную с использованием Fluo-8 NW, с величиной концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} около 1×10^{-7} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее или около 1×10^{-9} М или менее.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, является антителом, специфически связывающимся с CCL17, причем антитело содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3), при этом HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 5, 71, 72, 73 и 74 соответственно.

Антитела, содержащие последовательности HCDR и LCDR с SEQ ID NO: 4, 5, 71, 72, 73 и 74, связывают человеческий CCL17 с K_D 1×10^{-10} или менее.

HCDR1: SYWIG (SEQ ID NO: 4).

HCDR2: IIDPSDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 5).

Консенсусная последовательность HCDR3:

VGPADVWD_{X1}FDY (SEQ ID NO: 71),

где X_1 представляет собой S, A или T.

Консенсусная последовательность LCDR1:

KSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LA (SEQ ID NO: 72),

где X_1 представляет собой L, Y, S или N;

X_2 представляет собой F, P, H или I;

X_3 представляет собой D, Y, W, T или V;

X_4 представляет собой I, F, S, T, Y, N, K или V; и

X_5 представляет собой K, A, Q, T или D.

Консенсусная последовательность LCDR2:

X₁ASTRE (SEQ ID NO: 73),

где X_1 представляет собой N, H, G, E, T или D.

Консенсусная последовательность LCDR3:

QQX₁X₂X₃X₄PX₅T (SEQ ID NO: 74);

где X_1 представляет собой F, Y, T или H;

X_2 представляет собой Y, L, N или W;

X_3 представляет собой S, A, L, I, T, Q или H;

X_4 представляет собой V, T, I, Y, L или D; и

X_5 представляет собой S, F, A или L.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HCDR1 содержит последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит последовательность SEQ ID NO: 5 и HCDR3 содержит последовательность SEQ ID NO: 6, 42, 43 или 44 в антителе изобретения, специфически связывающемся с CCL17.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 5, а HCDR3 содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6, 42 или 43.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, LCDR1 содержит последовательность SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18. LCDR2 содержит последовательность SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 39, 40 или 41; и LCDR3 содержит последовательность SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38 в антителе изобретения, специфически связывающемся с CCL17.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, LCDR1 содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17 или 18, LCDR2 содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 24, 25 или 26, а LCDR3 содержит аминокислотные

последовательности с SEQ ID NO: 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37 или 38.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело, специфически связывающееся с CCL17, содержит VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 76.

Консенсусная последовательность VH (SEQ ID NO: 75)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTR

YSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGPADVWDX₁FDYWGQGTLLTVSS

где X₁ представляет собой S, A или T.

Консенсусная последовательность VL (SEQ ID NO: 76)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LAWYQQKPGQPPKLLIYY

₆ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITISSLQAEDVAVYYCQQX₇X₈X₉X₁₀PX₁₁TFGQGTKVEIK;

где X₁ представляет собой L, Y, S или N;

X₂ представляет собой F, P, H или I;

X₃ представляет собой D, Y, W, T или V;

X₄ представляет собой I, F, S, T, Y, N, K или V;

X₅ представляет собой K, A, Q, T или D;

X₆ представляет собой N, H, G, E, T или D;

X₇ представляет собой F, Y, T или H;

X₈ представляет собой Y, L, N или W;

X₉ представляет собой S, A, L, I, T, Q или H;

X₁₀ представляет собой V, T, I, Y, L или D; и

X₁₁ представляет собой S, F, A или L.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело, специфически связывающееся с CCL17, содержит VH с SEQ ID NO: 45, 46, 47 или 48.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело, специфически связывающееся с CCL17, содержит VL с SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело, специфически связывающееся с CCL17, содержит VH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, 46 или 47.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело, специфически связывающееся с CCL17, содержит VL, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60 или 62.

Другой вариант осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, является выделенным антителом, специфически связывающимся с CCL17, причем антитело содержит последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 19 и 27 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 20 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 9, 21 и 29 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 22 и 30 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 11, 23 и 31 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 12, 24 и 32 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13, 21 и 33 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 14, 20 и 34 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 15, 25 и 35 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 16, 21 и 36 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 17, 25 и 37 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 18, 26 и 38 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 39 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 24 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 22 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 40 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 26 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 41 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 42, 8, 24 и 28 соответственно;

SEQ ID NO: 4, 5, 43, 8, 24 и 28 соответственно; или

SEQ ID NO: 4, 5, 44, 8, 24 и 28 соответственно.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит

VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 или 66;

VH и VL с SEQ ID NO: 46 и 62 соответственно;
 VH и VL с SEQ ID NO: 47 и 62 соответственно; или
 VH и VL с SEQ ID NO: 48 и 62 соответственно.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит

VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59 или 60;
 VH и VL с SEQ ID NO: 46 и 62 соответственно; или
 VH и VL с SEQ ID NO: 47 и 62 соответственно.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 50.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 51.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 52.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 55.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 56.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 57.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 59.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 60.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 46 и VL с SEQ ID NO: 62.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, - это выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17, причем антитело содержит VH с SEQ ID NO: 47 и VL с SEQ ID NO: 62.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, является выделенным антителом, специфически связывающимся с CCL17, причем антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную VH с SEQ ID NO: 46, и VL, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную VL с SEQ ID NO: 62.

Примерами таких антител являются антитела, приведенные в таб. 9.

В пределы объема настоящего изобретения входят антитела, в которых CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи, аминокислотные последовательности VH или VL несущественно отличаются от данных элементов, показанных в таблицах 3, 4, 6, 7 и 9. Как правило, это включает одну или более консервативных аминокислотных замен на аминокислоту, имеющую аналогичный заряд, гидрофобные или стереохимические характеристики в антигенсвязывающем сайте или в каркасе без неблагоприятного изменения свойств антитела. Также могут быть осуществлены консервативные замены, улучшающие свойства антитела, например стабильность или аффинность. Например, возможно введение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен в последовательности VH или VL. Например, "консервативные аминокислотные замены" могут включать замену нативных аминокислотных остатков на ненативные остатки, такие как остатки, которые не сопровождаются изменением или сопровождаются незначительными изменениями полярности или заряда аминокислотного остатка в этом положении. Более того, любой природный аминокислотный остаток в полипептиде может быть замещен аланином согласно способу, описанному как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al. (1998) Act. Physiol.

Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki et al (1998) Adv. Biopsy's. 35:1-24). Желаемые аминокислотные замены могут определить специалисты в данной области, когда такие замены необходимы. Например, аминокислотные замены могут быть использованы для того, чтобы идентифицировать важные аминокислотные остатки в последовательности или с целью увеличения/уменьшения аффинности молекул, предложенных в настоящем изобретении. Каждая из представленных ниже восьми групп содержит аминокисло-

ты, которые являются консервативными аминокислотными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, *Proteins* (1984)).

Аминокислотные замены могут быть осуществлены, например, с помощью ПЦР мутагенеза (патент США № 4683195). Библиотеки вариантов можно создать с использованием хорошо известных способов, например путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), а также скрининга библиотек на наличие вариантов с желаемыми свойствами.

Хотя варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, содержат переменные области, одну для тяжелой цепи и одну для легкой цепи, специалисты поймут, что альтернативные варианты осуществления могут содержать различные переменные области тяжелой или легкой цепи. Одиночная переменная область может использоваться для скрининга переменного домена, способного к формированию двухцепочечного специфического антигенсвязывающего фрагмента, способного, например, связываться с человеческим CCL17, имеющим последовательность SEQ ID NO: 1. Такой поиск может осуществляться с помощью методов фагового отображения, например, с использованием иерархического двойного комбинаторного подхода, описанного в международной патентной публикации WO 1992/01047. Согласно указанному методу индивидуальная колония, содержащая клон Н или L цепей, используется для инфицирования всей библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), а появляющийся в результате двухцепочечный специфический антигенсвязывающий домен селективно отбирается в соответствии с методами фагового отображения. Следовательно, отдельные цепи полипептидов VH и VL используют для идентификации дополнительных антител, специфически связывающихся с человеческим CCL17, имеющих последовательность SEQ ID NO: 1, с использованием способов, описанных в международной патентной публикации WO 1992/01047.

Антитела изобретения, описанного в документе, могут быть получены с использованием ряда технологий для создания моноклональных антител. Например, можно использовать метод гибридом из публикации Kohler and Milstein, *Nature* 256:495, 1975. В методе гибридом мышь или другого животного-хозяина, такого как хомяк, крыса или обезьяна, иммунизируют белком человеческого CCL17 и/или CCL17 яванского макака, или фрагментами этих белков, такими как внеклеточный участок человеческого CCL17, с последующим слиянием клеток селезенки от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов для образования клеток гибридомы (Gooding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Колонии, произрастающие из клеток одной иммортализованной гибридомы, проверяют на продукцию антител с желаемыми качествами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие и аффинность к антигену.

Для продуцирования антител к человеческому CCL17 можно использовать различных животных-хозяев. Например, для создания мышинных антител к человеческому CCL17 можно использовать мышей Balb/c. Антитела, полученные от мышей Balb/c и от других животных, можно гуманизировать с использованием различных технологий для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими. Примеры методик гуманизации, включая выбор человеческих акцепторных каркасов, известны специалистам в данной области и включают пересадку CDR (патент США № 5225539), пересадку определяющей специфичность области (SDR) (патент США № 6818749), ремоделирование (Palin, *Mol. Immunol.* 28:489-499, 1991), ремоделирование определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), человеческая адаптация (или адаптация человеческих каркасов) (патентная публикация США № US 2009/0118127), супер-гуманизация (патент США № 7709226) и управляемая селекция (Osborn et al., *Methods* 36:61-68, 2005; патент США № 5565332).

Гуманизированные антитела можно дополнительно оптимизировать для улучшения их селективности или аффинности к желаемому антигену путем включения остатков, поддерживающих измененный каркас, для сохранения аффинности связывания (обратных мутаций) с помощью таких методик, как описанные в международной патентной публикации WO 1990/007861 и в международной патентной публикации WO 1992/22653.

Для создания человеческих антител к белку-мишени можно использовать трансгенных мышей, несущих в своем геноме локусы человеческого иммуноглобулина, и они описаны, например, в международной патентной публикации WO 1990/04036; патенте США № 6150584; международной патентной публикации WO 1999/45962 или международной патентной публикации WO 2002/066630; международной патентной публикации WO 2002/43478; Loner et al., *Nature* 368:856-9, 1994; Green et al., *Nature Genet.* 7:13-21, 1994; Green & Jakobovits *Exp. Med.* 188:483-95, 1998; Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 1995; Bruggemann et al., *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326, 1991; Fishwild et al., *Nat. Biotechnol.* 14:845-851, 1996; Mendez et al., *Nat. Genet.* 15:146-156, 1997; Green, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, 1999; Yang et al., *Cancer Res.* 59:1236-1243, 1999; Bruggemann and Taussig, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458, 1997; международной патентной публикации WO 2002/043478). Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких мышей можно разрушить или удалить, и в мышинный геном можно вставить по меньшей мере

один полный или частичный локус человеческого иммуноглобулина с использованием гомологичной или негомологичной рекомбинации, с использованием трансхромосом или с использованием минигенов. Чтобы предоставить человеческие антитела, направленные против выбранного антигена, с использованием технологии, описанной выше, могут быть задействованы такие компании, как Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) и Ablexis (http://_www_ablexis_com).

Человеческие антитела можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг получен с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fabs, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные вариабельные области антител (Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J. Immunol. Meth.* 254:67-84, 2001; Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 14:309-314, 1996; Sheets et al., *PITAS (USA)* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581, 1991). Антитела изобретения можно выделить, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей вариабельные области легкой и тяжелой цепей антитела, в виде белков, слитных с белком оболочки бактериофага рIX, как описано в публикации Shi et al., *J. Mol. Biol.* 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации WO 2009/085462. В библиотеках антител был проведен скрининг на связывание с внеклеточным доменом человеческого CCL17, и затем полученные позитивные клоны были дополнительно охарактеризованы, из лизатов клонов были выделены Fab, и затем выполнена экспрессия полноразмерных IgG. Такое применение способов фагового дисплея для выделения человеческих антител известно в данной области. См., например, патенты США № 5223409; 5403484 и 5571698, выданные Ladner et al.; патенты США № 5427908 и 5580717, выданные Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197, выданные McCafferty et al.; и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданные Griffiths et al.

Подготовка иммуногенных антигенов и образование моноклонального антитела могут быть выполнены любым подходящим способом, например продукцией рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть заново образован в теле животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его участок.

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут быть человеческими или гуманизированными.

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут быть синтетическими или рекомбинантными.

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут относиться к типу IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут относиться к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Иммуноэффektorные свойства антител изобретения также могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc-фрагмента с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области. Например, эффektorные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR) и т.п. могут модулироваться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия. Фармакокинетические свойства также можно усилить с помощью мутации остатков в домене Fc, который продлевает период полужизни антитела. Примерами модификаций Fc являются S228P/L234A/L235A IgG4, M252Y/S254T/T256E IgG2 (Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.* 281:23514-24, 2006), или V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 IgG2, или V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S на IgG2 (международная патентная публикация WO 2011/066501), или модификации, описанные в патенте США № 6737056 (нумерация согласно нумерации ЕС).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело, специфически связывающееся с человеческим CCL17, содержит замену в области Fc.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, заместитель содержит замену V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S или P331S на IgG2, или замену S228P, L234A или L235A на IgG4, причем нумерация остатков соответствует индексу ЕС.

Кроме того, антитела настоящего изобретения можно модифицировать посттрансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ненатуральная ковалентная модификация, такая как присоединение фрагментов полиэтиленгликоля (пегилирование) или липидизация. Такие модификации могут происходить в условиях *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пегилированы) с целью улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена с помощью способов, известных специалистам в данной области. Отмечено, что конъюгация терапевтических антител с PEG улучшает фармакодинамику, в то же время не оказывая влияния на функцию (Knight et al., *Platelets* 15:409-418, 2004; Leong et al., *Cytokine* 16:106-119, 2001; Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-770, 2003).

Антитела или их фрагменты, составляющие предмет настоящего изобретения и описанные в данном документе, модифицированные с целью улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических или биофизических характеристик, также находятся в пределах объема настоящего изобретения. Стабильность антитела определяется целым рядом факторов, включая: (1) пространственную укладку индивидуальных доменов, влияющее на естественную стабильность; (2) поверхностное взаимодействие белков, определяющее спаривание HC и LC; (3) глубину расположения полярных и заряженных аминокислотных остатков; (4) сеть водородных мостиков между полярными и заряженными аминокислотными остатками; и (5) поверхностный заряд и распределение полярных аминокислотных остатков наряду с другими внутри- и межмолекулярными взаимодействиями (Worn and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 305:989-1010, 2001). Остатки, способные дестабилизировать структуру, можно идентифицировать на основе кристаллической структуры антитела или путем молекулярного моделирования в определенных случаях, а эффект остатков на стабильность антитела можно тестировать путем создания вариантов мутаций в идентифицированных остатках и их оценки. Один из способов увеличения стабильности антитела заключается в увеличении срединной точки термоперехода (T_m), измеряемой с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Как правило, T_m белка имеет положительную корреляцию с его стабильностью и отрицательную корреляцию с подверженностью нарушениям третичной структуры и денатурации в растворах, а также деградации, которая также зависит от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele et al., *Pharm. Res.* 15:200-208, 1997). Ряд исследований свидетельствует о корреляции между степенью физической стабильности составов, измеренной как термостабильность с помощью DSC, и физической стабильностью, измеренной с помощью других способов (Bedu-Addo et al., *Pharm. Res.* 21:1353-1361, 2004; Gupta and Kaisheva, *AAPS Phar.Sci.*, 5E8, 2003; Maa and Hsu, *Int. J. Pharm.* 140:155-168, 1996; Remmele et al., *Pharm. Res.* 15:200-208, 1997; Zhang et al., *J. Pharm. Sci.* 93:307 6-3089, 2004). Результаты исследований состава позволяют предположить, что T_m Fab-фрагмента влияет на долговременную физическую стабильность соответствующего mAb. Различия в аминокислотах либо каркасного фрагмента, либо областей CDR могут существенно влиять на термическую стабильность домена Fab (Yasui et al., *FEBS Lett.* 353:143-146, 1994).

Антитела к CCL17 настоящего изобретения можно получить в виде биспецифических антител, которые также входят в пределы объема настоящего изобретения. Из областей VL и/или VH антител настоящего изобретения с использованием опубликованных способов можно получить одноцепочечные биспецифические антитела в виде структур, таких как структуры TandAb® (международная патентная публикация WO 1999/57150; патентная публикация США US 2011/0206672), или биспецифические scFV в виде структур, таких как описанные в патенте США № 5869620, международной патентной публикации WO 1995/15388, международной патентной публикации WO 1997/14719 или международной патентной публикации WO 2011/036460.

Из областей VL и/или VH антител настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, можно получить биспецифические полноразмерные антитела, где каждое плечо антитела связывается со своим антигеном или эпитопом. Такие биспецифические антитела, как правило, получают модулированием взаимодействий CH3 между двумя тяжелыми цепями антител с образованием биспецифических антител с использованием таких способов, как описанные в патенте США № 7695936; международной патентной публикации WO 2004/111233; патентной публикации США US 2010/0015133; патентной публикации США US 2007/0287170; международной патентной публикации WO 2008/119353; патентной публикации США US 2009/0182127; патентной публикации США US 2010/0286374; патентной публикации США US 2011/0123532; международной патентной публикации WO 2011/131746; международной патентной публикации WO 2011/143545 или патентной публикации США US 2012/0149876. Дополнительными биспецифическими структурами, в которые могут встраиваться области VL и/или VH антител настоящего изобретения, являются, например, иммуноглобулины с двойными переменными доменами (международная патентная публикация WO 2009/134776) или структуры, включающие в себя различные димеризационные домены для соединения двух обладающих разной специфичностью плеч антител, например "лейциновую застежку" или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация WO 2012/022811, патентная публикация США № 5932448; патент США № 6833441).

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий любую из переменных областей тяжелой цепи антитела или переменных областей легкой цепи антитела настоящего изобретения. Некоторые полинуклеотиды описываются в настоящем изобретении, однако другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют предложенные в настоящем изобретении антагонисты, также находятся в пределах объема настоящего изобретения. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие VH или VL (или их фрагмент) антитела изобретения, могут быть функционально соединены с одним или более регуляторными элементами, такими как промотор или энхансер, которые позволяют экспрессировать нуклеотидную последовательность в запланированной клетке-хозяине. Полинуклеотид может являться кДНК.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий

полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, подходящие для введения полинуклеотида настоящего изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение каким-либо образом. Например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепей антител изобретения, необязательно соединенные с константными областями, вставлены в векторы экспрессии. Легкую и тяжелую цепи можно клонировать в том же или в разных векторах экспрессии. ДНК-сегменты, кодирующие иммуноглобулиновые цепи, функционально соединяют в векторе (векторах) экспрессии с контрольными последовательностями, обеспечивающими экспрессию иммуноглобулиновых полипептидов. К таким управляющим последовательностям относятся сигнальные последовательности, промоторы (например, естественно ассоциированные или гетерологичные промоторы), энхансерные элементы и останавливающие транскрипцию последовательности, и их выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии антитела. После введения вектора в соответствующего хозяина проводят инкубацию хозяина в условиях, подходящих для высокоуровневой экспрессии белков, кодируемых введенными полинуклеотидами.

Как правило, подходящие экспрессионные векторы могут подвергаться репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат маркеры селекции, например, резистентность к ампициллину, резистентность к гигромицину, резистентность к тетрациклину, резистентность к канамицину или резистентность к неомицину, чтобы можно было выполнить обнаружение клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК.

Подходящие элементы промотора и энхансера известны в данной области. Примеры промоторов для экспрессии в бактериальной клетке включают *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, *lambda P* и *trc*. Примеры промоторов для экспрессии в эукариотической клетке включают элементы промотора и энхансера гена тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина; непосредственный ранний промотор цитомегаловируса; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ранние и поздние промоторы SV40; промотор, присутствующий в длинных терминальных повторах из ретровируса; промотор мышинного металлопротеина-1 и различные тканеспецифические промоторы, известные в данной области. Примером промотора для экспрессии в дрожжевой клетке является конститутивный промотор, такой как промотор ADHI, промотор PGK1, промотор ENO, промотор PYK1 и т.п. или регулируемый промотор, такой как промотор GAL1, промотор GAL10, промотор ADH2, промотор PH05, промотор CUP1, промотор GAL7, промотор MET25, промотор MET3, промотор CYC1, промотор HIS3, промотор ADHI, промотор PGK, промотор GAPDH, промотор ADC1, промотор TRP1, промотор URA3, промотор LEU2, промотор ENO, промотор TP1 и AOX1 (например, для применения в дрожжах пихии (*Pichia*)). Выбор подходящего вектора и промотора вполне по силам обычному специалисту в данной области.

Специалистам в данной области известны большие количества подходящих векторов и промоторов; многие доступны на рынке для создания предметных рекомбинантных конструкций. Следующие векторы представлены в качестве примера. Бактериальные: phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia).

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор изобретения. Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую вводят вектор. Следует понимать, что термин "клетка-хозяин" означает не только конкретную клетку субъекта, но и потомков такой клетки. Так как в последующих поколениях могут возникнуть некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство может быть не идентичным исходной клетке, но оно также может быть охвачено термином "клетка-хозяин". Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей.

Кишечная палочка (*Escherichia coli*), бациллы, такие как сенная палочка (*Bacillus subtilis*), и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы, серрации и различные виды псевдомонад, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Также для экспрессии используют другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромикеты (например, *S.cerevisiae*) и пихии являются примерами подходящих дрожжевых клеток-хозяев. Как правило, используются эукариотические клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580) мышинные клеточные линии. Обычно используется линия клеток миеломы человека U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие полезные клеточные линии включают линии, полученные из яичников китайского хомячка (CHO), например линии CHO-K1SV (Lonza Biologies, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в способе получения антител, включающем культивирование предложенных в настоящем изобретении клеток-хозяев и отбор антител,

производимых клетками-хозяевами. Способы создания и очистки антител хорошо известны специалистам в данной области. После синтеза (химического либо рекомбинантного) целые антитела, их димеры, отдельные легкие или тяжелые цепи или другие фрагменты антител, такие как VH или VL, можно очищать согласно стандартным процедурам данной области, включая осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, очистку с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), электрофорез в геле и т.п. (см. в основном Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Заявленное антитело может быть, по существу, чистым, например чистым на по меньшей мере около от 80 до 85%, чистым на по меньшей мере около от 85 до 90%, чистым на по меньшей мере около от 90 до 95%, чистым на по меньшей мере около от 98 до 99% или более, например не содержащим загрязнителей, таких как клеточный детрит, макромолекулы, отличные от заявленного антитела, и т.д.

Полинуклеотиды, кодирующие определенные последовательности VH или VL изобретения, включены в векторы с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клетки-хозяина, культивирование, экспрессию и очистку антитела выполняют с использованием хорошо известных способов.

Способы лечения.

Антитела, специфически связывающиеся с человеческим CCL17, могут быть подходящими для лечения или предотвращения спектра CCL17-опосредованных состояний.

При использовании в настоящем документе термин "CCL17-опосредованное состояние" охватывает все заболевания и состояния, в которых CCL17 играет какую-либо прямую или косвенную роль, включая этиологическую или патогенетическую, роль в развитии, прогрессировании или устойчивости заболевания или состояния.

Термин "CCL17-опосредованное воспалительное состояние", используемый в настоящем документе, относится к воспалительному состоянию, вызванному, по меньшей мере отчасти, биологической активностью CCL17. Примерами CCL17-опосредованных воспалительных состояний являются астма и аллергии.

Способы настоящего изобретения можно использовать для лечения пациента-животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные. Например, антитела изобретения используют в профилактике и лечении CCL17-опосредованных состояний, таких как бронхиальная астма, и аллергических респираторных заболеваний, таких как аллергическая астма, аллергический ринит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), идиопатический легочный фиброз (ИЛФ), заболевания гиперчувствительности легких и т.п.; аллергических заболеваний, таких как системная анафилаксия или реакции гиперчувствительности, лекарственные аллергии, аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБРА), аллергии на укусы насекомых и пищевые аллергии; воспалительных заболеваний кишечника, таких как болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, илеит и энтерит; вагинита; псориаза и воспалительных дерматозов, таких как дерматит, экзема, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, крапивница и зуд; васкулита; спондилоартропатии; склеродермии; аутоиммунных заболеваний, таких как артрит (включая ревматоидный и псориатический), рассеянный склероз, системная красная волчанка, сахарный диабет типа I, гломерулонефрит и т.п.; отторжений трансплантата (включая отторжение аллотрансплантата и болезнь "трансплантат-против-хозяина") и других заболеваний, при которых требуется ингибирование нежелательных воспалительных реакций, таких как атеросклероз, миоцит, опосредованные Т-клетками нейродегенеративные заболевания, рассеянный склероз, энцефалит, менингит, гепатит, нефрит, сепсис, саркоидоз, аллергический конъюнктивит, отит, болезнь Кастлемана, синусит, индуцированный ЛПС эндотоксический шок, синдром Бехчета и подагра.

Антитела настоящего изобретения, описанные в данном документе, также подходят для получения лекарственных средств для лечения таких состояний, причем лекарственные средства получают для введения в дозировках, определенных в настоящем документе.

Способы и сферы применения настоящего изобретения могут предназначаться для применения у животных и пациентов, которые имеют любое заболевание или состояние (или находятся в группе риска по его развитию), связанное с экспрессией или биологической активностью CCL17, или при котором CCL17 играет биологическую роль.

Без необходимости ограничения какой-либо теорией антитела изобретения могут обеспечивать свой действенный эффект при различных воспалительных заболеваниях путем прямого ингибирования рекрутинга Tn2-клеток и, таким образом, одновременного ингибирования множества цитокинов Tn2. Путем селективного блокирования только CCL17 антитела изобретения могут обеспечивать улучшенный профиль безопасности по сравнению с антителами к CCR4. Антитела не будут взаимодействовать с тромбоцитами, которые экспрессируют CCR4. Кроме того, антитела не будут блокировать полезные эффекты CCL22 на CCR4 в рамках врожденного иммунитета (Matsukawa et al., I. Immunol. 164:5382-8, 2000).

При использовании в настоящем документе термин "воспалительное состояние" относится к острому или хроническому локализованному или системному ответу на повреждающие стимулы, такие как патогены, поврежденные клетки, физическое повреждение или раздражающие вещества, которые час-

тично опосредованы активностью цитокинов, хемокинов или воспалительных клеток (например, нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, макрофагов, тучных клеток, дендритных клеток, нейтрофилов) и характеризуются в большинстве случаев болью, покраснением, отеком и нарушением функций тканей.

Воспалительное заболевание легких является примером CCL17-опосредованного воспалительного заболевания. Примеры воспалительных заболеваний легких включают в себя инфекционные болезни легких, вызванные вирусными, бактериальными, грибковыми, паразитарными или прионными инфекциями; заболевания легких, вызванные аллергенами; заболевания легких, вызванные загрязняющими факторами, такие как асбестоз, силикоз или бериллиоз; заболевания легких, вызванные аспирацией желудочного содержимого, нарушением иммунной регуляции, воспалительные заболевания с генетической предрасположенностью, такие как муковисцидоз, и заболевания легких, вызванные физической травмой, такие как травмы дыхательных путей. Данные воспалительные заболевания также включают в себя астму, эмфизему, бронхит, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), саркоидоз, гистиоцитоз, лимфоангиоматоз, острое повреждение легких, синдром острого нарушения дыхания, хроническое заболевание легких, бронхопульмональную дисплазию, внебольничную пневмонию, госпитальную пневмонию, вызванную искусственной вентиляцией легких пневмонию, сепсис, вирусную пневмонию, инфекцию гриппа, инфекцию парагриппа, инфекцию ротавируса, инфекцию человеческого метапневмовируса, респираторно-синцитиальную инфекцию, инфекции, вызванные *Aspergillus*, и другие грибковые инфекции. Как правило, связанные с инфекцией воспалительные заболевания могут включать вирусную или бактериальную пневмонию, включая тяжелую пневмонию, кистозный фиброз, бронхит, обострения заболеваний дыхательных путей и синдром острого нарушения дыхания (ARDS). Такие связанные с инфекцией заболевания могут вовлекать множество инфекций, таких как первичная вирусная и вторичная бактериальная инфекция.

Бронхиальная астма является воспалительным заболеванием легких, которое характеризуется гиперчувствительностью дыхательных путей (АНР), бронхостенозом, хрипами в легких, эозинофильным или нейтрофильным воспалением, гиперсекрецией слизи, субэпителиальным фиброзом и увеличением уровня иммуноглобулина IgE. Пациенты с бронхиальной астмой испытывают "приступы", ухудшение симптомов, чаще всего вследствие инфекций респираторного тракта (например, риновируса, гриппа, гемфильной инфекции и пр.). Астматические атаки могут провоцироваться факторами окружающей среды (например, аскаридами, насекомыми, животными (например, кошками, собаками, кроликами, мышами, крысами, хомячками, морскими свинками и птицами), грибами, загрязнением воздуха (например, табачным дымом), раздражающими газами, запахами, испарениями, аэрозолями, химикатами, пылью, физическими упражнениями или холодным воздухом). Кроме бронхиальной астмы, некоторые хронические поражающие легкие воспалительные заболевания характеризуются нейтрофильной инфильтрацией дыхательных путей, например хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), бактериальная пневмония и муковисцидоз (Linden et al., *Eur. Respir. J.* 15:973-7, 2000; Rahman et al., *Clin. Immunol.* 115:268-76, 2005), а такие заболевания, как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), аллергические риниты и муковисцидоз, характеризуются гиперчувствительностью дыхательных путей (Fahy и O'Byrne, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:822-3, 2001).

При аллергической бронхиальной астме наличие высоких уровней аллерген-специфических IgE является отображением aberrантного иммунного ответа Тn2-клеток на обычно вдыхаемые аллергены окружающей среды. Дендритные клетки (DC), которые непрерывно анализируют поступающие чужеродные антигены, презентуют аллергены Т-клеткам. После специфической активации посредством DC аллерген-специфические лимфоциты, присутствующие в пораженных дыхательных путях, продуцируют Тn2-цитокины интерлейкин (IL)-4, IL-5 и IL-13 - которые дополнительно контролируют трансудацию лейкоцитов, гиперплазию бокаловидных клеток и бронхиальную гиперреактивность (BHR). CCL17, продуцируемые DC, путем стимуляции CCR4 индуцируют селективную миграцию Тn2-клеток, но не Th1-клеток. Такое лечение антителами к CCL17 снижало число CD4+ Т-клеток и эозинофилов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (BAL), продукцию цитокинов Тn2 и гиперреактивность дыхательных путей после антигенного стимула в моделях бронхиальной астмы у мышей, указывая на то, что нейтрализация CCL17 является осуществимой стратегией ингибирования аллергического воспаления у человека.

Часто применяемые модели бронхиальной астмы и воспаления дыхательных путей включают в себя модель со стимуляцией овальбумином, модели с метахолиновой сенсibilизацией и сенсibilизацией *Aspergillus fumigatus* (Hessel et al., *Eur. J. Pharmacol.* 293:401-12, 1995). Ингибирование продукции цитокинов и хемокинов в культурах человеческих эпителиальных бронхиальных клеток, бронхиальных фибробластов или клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей может быть использовано в качестве экспериментальных моделей *in vitro*. Введение антител изобретения в любую из данных моделей можно использовать для оценки эффективности облегчения симптомов и изменения течения бронхиальной астмы, воспаления дыхательных путей, ХОБЛ и т.п.

Атопический дерматит является примером CCL17-опосредованного воспалительного состояния.

Один аспект изобретения является способом лечения CCL17-опосредованного заболевания, включающим в себя введение антитела изобретения нуждающемуся в этом субъекту в течение времени, достаточного для лечения CCL17-опосредованного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, CCL17-опосредованное заболевание является воспалительным заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, воспалительное заболевание представляет собой астму, язвенный колит (ЯК), atopический дерматит (АД) или идиопатический легочный фиброз (ИЛФ).

Один вариант осуществления изобретения является способом лечения бронхиальной астмы, включающим в себя введение антитела, описанного в настоящем документе изобретения, субъекту в течение времени, достаточного для лечения бронхиальной астмы.

Один вариант осуществления изобретения является способом лечения язвенного колита, включающим в себя введение антитела, описанного в настоящем документе изобретения, субъекту в течение времени, достаточного для лечения язвенного колита.

Один вариант осуществления изобретения является способом лечения atopического дерматита, включающим в себя введение антитела, описанного в настоящем документе изобретения, субъекту в течение времени, достаточного для лечения atopического дерматита.

Один вариант осуществления изобретения является способом лечения идиопатического легочного фиброза, включающим в себя введение антитела, описанного в настоящем документе изобретения, субъекту в течение времени, достаточного для лечения идиопатического легочного фиброза.

Введение/фармацевтические композиции.

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела, специфически связывающие CCL17 настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения антитела, специфически связывающие CCL17 настоящего изобретения, могут быть получены в виде фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество домена, молекул или антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителям, адъювантам, эксципиентам или носителю, вместе с которыми вводится активное соединение. Такие носители могут быть жидкостями, такими как вода и масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно использовать 0,4%-ный соляной раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых примесей. Затем стерилизацию проводят с использованием стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, сгущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т.п. Концентрация молекул или антител настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно от по меньшей мере приблизительно 1% вплоть до 15 или 20 мас.%, и будет выбираться преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Подходящие носители и составы, включая другие белки человека, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см. в особенности стр. 958-989.

Режим введения для терапевтического применения антител, специфически связывающихся с CCL17, настоящего изобретения, описанных в данном документе, может представлять собой любой соответствующий путь, обеспечивающий доставку агента в организм хозяина, такой как парентеральное введение, например внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное, подкожное, легочное; через слизистые оболочки (перорально, интраназально, интравагинально, ректально); с использованием состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, гранул; и содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе; или же с помощью других средств, очевидных для квалифицированного специалиста, которые хорошо известны в данной области. Локализованное введение можно обеспечить, например, путем доставки в сустав, бронхи, брюшную полость, внутрь капсулы, хрящ, полость, клетку, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, брюшину, плевру, простату, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, в поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Таким образом, фармацевтическую композицию настоящего изобретения, описанную в данном документе, для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной воды буфера и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мг/кг, например от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг/кг, или более предпочтительно от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг/кг антитела, специфически связывающегося с CCL17 настоящего изобретения.

Доза, вводимая пациенту, имеющему CCL17-опосредованное состояние, достаточна для того, чтобы облегчить симптомы или осуществить лечение CCL17-опосредованного состояния ("терапевтически

эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,1 до 10 мг/кг веса тела, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Также можно обеспечивать фиксированную разовую дозу, например, 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может зависеть от площади поверхности тела пациента, например 400, 300, 250, 200 или 10 мг/м². Обычно вводят от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить 10, 12, 20 или более доз. Введение антител, специфически связывающихся с CCL17, настоящего изобретения, описанных в данном документе, можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного применения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе.

Дозировку антител к CCL17 по изобретению, описанному в данном документе, которая будет эффективна в лечении иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, таких как бронхиальная астма, можно определить путем введения антител к CCL17 в соответствующие животные модели, хорошо известные в данной области и описанные в настоящем документе.

Для идентификации оптимальных диапазонов дозы можно дополнительно использовать анализы *in vitro*. Выбор конкретной эффективной дозы (например, с помощью клинических испытаний) может осуществляться специалистами в данной области на основе нескольких факторов. Такие факторы включают подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы заболевания, массу тела пациента, иммунологический статус пациента и другие известные специалистам факторы. Точная доза, предназначенная для применения в составе композиции, также зависит от пути введения и тяжести заболевания, и должна определяться на основании решения лечащего врача и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривой динамики "доза-ответ", полученной в тестовых системах моделей животных *in vitro*. Антитела по изобретению можно протестировать на предмет их эффективности и эффективной дозировки с использованием любой из моделей, описанной в документе.

Например, фармацевтическую композицию, содержащую антитела, специфически связывающиеся с CCL17, настоящего изобретения, описанные в данном документе, для внутривенной инфузии можно приготовить таким образом, чтобы она содержала приблизительно 200 мл стерильного раствора Рингера и от приблизительно 8 мг до приблизительно 2400 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 1600 мг или от приблизительно 400 мг до приблизительно 800 мг антител, специфически связывающихся с CCL17, настоящего изобретения для введения пациенту весом 80 кг. Способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Антитела, специфически связывающиеся с CCL17, настоящего изобретения, описанные в данном документе, могут быть лиофилизированы для хранения и впоследствии перед использованием восстановлены (растворены) в подходящем носителе. Было показано, что данная методика эффективна для стандартных белковых препаратов, при этом можно использовать известные в данной области способы лиофилизации и восстановления.

Антитела, специфически связывающиеся с CCL17, настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим средством одновременно, последовательно или отдельно.

Настоящее изобретение далее будет описано со ссылкой на нижеприведенные специфические примеры, не имеющие ограничительного характера.

Пример 1. Создание антител, нейтрализующих CCL17.

Человеческий CCL17, связывающийся с фрагментами Fab, отбирали из новых полученных дисплейных rIX-фаговых библиотек, описанных в публикации Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010; международной патентной публикации WO 2009/085462; патентной публикации США US 2010/0021477; патентной публикации США US 2012/0108795. Вкратце, библиотеки создавали путем диверсификации человеческих матриц, при которой гены VH зародышевой линии IGHV1-69*01, IGHV3-23*01 и IGHV5-51*01 рекомбинировали с человеческим минигеном IGHJ-4 посредством петли H3, а человеческие гены VL зародышевой линии 012 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01) и B3 (IGKV4-1*01) рекомбинировали с минигеном IGKJ-1 с получением полных доменов VH и VL. Для диверсификации выбирали те положения переменных областей легкой и тяжелой цепи вокруг петель H1, H2, L1, L2 и L3, для которых был выявлен частый контакт с белковыми и пептидными антигенами. Диверсификация последовательности в выбранных положениях ограничивалась остатками, появляющимися в каждом из положений в семействах зародышевых генов IGHV или IGLV для соответствующих генов IGHV или IGLV. Диверсификацию петли H3 создавали, используя синтетические короткие или средние петли длиной 7-14 аминокислот. Распределение аминокислот в петле H3 выполняли аналогично наблюдаемой вариации аминокислот в человеческих антителах. Создание библиотеки подробно описано в Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010. Матрицы, использованные для создания библиотек, получали наименования в соответствии с их происхождением от человеческого зародышевого гена VH и VL. Три библиотеки тяжелых цепей скомбинировали с четырьмя зародышевыми легкими цепями или библиоте-

ками зародышевых легких цепей, создав 24 уникальных комбинации VH:VL для сканирования. Все 24 библиотеки комбинаций VH:VL использовали в экспериментах фагового просеивания относительно человеческого CCL17.

Пэннинг библиотек выполняли с использованием человеческого CCL17 с SEQ ID NO: 1. Вкратце, человеческий CCL17 биотинилировали с использованием стандартных способов, и биотинилированный человеческий CCL17 (Bt-huCCL17) захватывали на магнитные гранулы (Dynal, M280), покрытые стрептавидином, и к гранулам добавляли Fab-pIX-фаговые библиотеки. Используемые концентрации Bt-huCCL17 составляли 100 нМ для циклов 1 и 2 и 10 нМ - для циклов 3 и 4. Скрининг связывания Fab с человеческим белком CCL17 выполнен с помощью ИФА. Для пэннинга покрытые bt-huCCL17 магнитные гранулы промывали и блокировали с PBST-M (фосфатно-натриевый буфер (PBS) с 0,05% Tween-20 и 3% обезжиренного сухого молока). На протяжении цикла 1 блокированный фаг из библиотек добавляли к гранулам и вращали при комнатной температуре. Гранулы промывали и далее инкубировали в культуре клеток (MC1061F) *E.coli* в лаг-фазе, и инфицированные *E.coli* выращивали на планшетах с агаром-LB в течение ночи при 37°C. На следующее утро культуры соскребали с планшетов на среду с 2 мл 2хYT (20% глицерин) на каждый планшет, к 50 мл 2хYT (углевод) добавляли 50 мкл бактериальной суспензии и выращивали при 37°C, встряхивая в течение до 2 ч. К культурам в середине лаг-фазы добавляли фага-помощника и культуры инкубировали при 37°C в течение 30 мин. К каждой культуре добавляли канамицин и изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечных концентраций 35 мкг/мл и 1 мМ соответственно и выращивали в течение ночи при 30°C, встряхивая. Амплифицированный фаг из бактериальной среды осаждали с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ)/NaCl и ресуспендировали в 1 мл PBS. Для следующего цикла пэннинга использовали 200 мкл.

После трех циклов пэннинга фагмидную ДНК выделяли из инфицированных клеток MC1061F' и расщепляли рестрикционными ферментами для удаления последовательности, кодирующей pIX, и линейную плазмидную ДНК вырезали и очищали от агарозных гелей. Впоследствии эта ДНА самолигировалась с ДНК-лигазой T4. Лигированную ДНК электропорировали в клетки MC1061F' и наносили на планшеты с агаром-LB (углевод/глюкоза). Колонии от этой электропорации выбирали для ИФА-скрининга и оценки экспрессии Fab. На С-конце тяжелой цепи фрагменты Fab содержат внутрикаркасный His-тег. После первичного скрининга 24 фрагменты Fab частично очищали посредством С-терминального His-тега с использованием стандартных способов и дополнительно характеризовали.

Фрагменты Fab характеризовали по их связыванию с человеческим CCL17 (SEQ ID NO: 1), CCL17 яванской макаки (SEQ ID NO: 2) и CCL22 яванской макаки (SEQ ID NO: 3) в анализе методом ИФА. Коротко, 96-луночные планшеты Maxisorp покрывали 1 мкг/мл козьих антител к человеческому Каппа (Southern Biotech). К каждому планшету добавляли полуочищенный Fab. К каждой лунке с захваченным Fab добавляли биотинилированный huCCL17, cCCL17 или CCCL22. Связанные с захваченными фрагментами Fab белки обнаруживали с использованием стрептавидина: пероксидазы хрена (HRP). Для созревания аффинности выбрали пять фрагментов Fab (F21, F24, F34, F43 и F44), которые связываются как с человеческим CCL17, так и с CCL17 яванского макака, но не с CCL22 яванского макака.

Пример 2. Созревание аффинности антител к CCL17.

Пять фрагментов Fab выбирали для созревания аффинности на основании их изначального профиля характеристик. Созревание аффинности фрагментов Fab обеспечивали путем диверсификации легких цепей с использованием технологии созревания в линии, описанной в работе Shi et al. (Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010), и сохранением инварианта тяжелой цепи. Тяжелая цепь в фрагментах Fab была либо VH3-23, либо VH5-51. Библиотеки созревания аффинности F24 формировали улучшенные лиганды CCL17.

Коротко, созревание аффинности F24 обеспечивали с использованием библиотеки V3 легких цепей. Схема диверсификации библиотеки V3 показана в табл. 2. Положения указаны в виде нумерации Кабат.

Таблица 2

Положение остатка (Кабат)	Остаток зародышевой линии	Композиции библиотеки
27d	Y	SYHFA
30	K	KTNE
32	Y	YFHNWDAS
50	W	YWSRDYA
91	Y	YSHA
92	Y	YNDSHIFK
93	S	SNTDGHR
94	T	TYLVFAS
96	L	WYFLIR

Области VH из фрагментов Fab клонировали в фагмид библиотеки LC, что приводило к полной по-

вторной диверсификации LC для каждого Fab. Области VH выделяли путем рестриктирования расщепления минипрепов ДНК с использованием NcoI и ApaI. Области VH выделяли из геля и лигировали в ДНК библиотеки LC, расщепленную подобным образом. Лигаты очищали и трансформировали в клетки MC1061F'. Клетки выращивали в 2хYT (углевод) до достижения лаг-фазы роста ($OD_{600nm} \approx 0,6$). Добавляли фаг-помощник, и культуры инкубировали при 37°C в течение 30 мин. К каждой культуре добавляли канамицин и ИПТГ до конечных концентраций 35 мкг/мл и 1 мМ соответственно и выращивали в течение ночи при 30°C, встряхивая. Фаг из бактериальной среды осаждали с использованием ПЭГ/NaCl и ресуспендировали в PBS.

Для пэннинга созревания аффинности Bt-CCL17 захватывали на 50 мкл покрытых стрептавидином (SA) магнитных гранул. Концентрации антигена составляли 100 нМ для цикла 1, 10 нМ для цикла 2 и 10 нМ для цикла 3. Гранулы подвергали воздействию 6 промывок с PBST и одной промывки с PBS с последующим инфицированием E.coli, как описано выше. Выделение плазмид с экспрессией Fab и экспрессию фрагментов Fab выполняли, как описано.

С помощью анализа ИФА проводили скрининг фрагментов Fab с созревшей аффинностью на связывание с huCCL17 (SEQ ID NO: 1) CCCL17 (SEQ ID NO: 2) и cCCL22 (SEQ ID NO: 3) как описано выше для связывания с huCCL17. Идентифицированные клоны секвенировали, преобразовывали в целые антитела IgG1 и с использованием MSD-SEA подтверждали их связывание с huCCL17, CCCL17 и CCCL22.

Последовательности CDR исходного антитела и антител с созревшей аффинностью показаны в табл. 3 и 4 для CDR с тяжелыми цепями и легкими цепями соответственно.

Таблица 3

Идентификатор MAb	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C17F24 (исходный)	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B234	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B235	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B236	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B237	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B238	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B239	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B240	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B241	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B242	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B243	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B244	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6

Таблица 4

Идентификатор MAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C17F24 (исходный)	KSSQSVLYSSNNKNYLA	7	WASTRES	19	QQYYSTPLT	27
C17B234	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	NASTRES	20	QQFYSPST	28
C17B235	KSSQSVLYSFYFNALALA	9	HASTRES	21	QQFYATPFT	29
C17B236	KSSQSVLLSPWNSNQLA	10	GASTRES	22	QQYYLIPST	30
C17B237	KSSQSVLTSYNNNSNYLA	11	LASTRES	23	QQYLSPPST	31
C17B238	KSSQSVLISAFNQNPALA	12	DASTRES	24	QQYQFIPFT	32
C17B239	KSSQSVLSSFTNTNTLA	13	HASTRES	21	QQYLIYPST	33
C17B240	KSSQSVLYSHVNYNALA	14	NASTRES	20	QQYYTLPAT	34
C17B241	KSSQSVLNSFTNNNALA	15	EASTRES	25	QQTNSIPLT	35
C17B242	KSSQSVLFSDNLNTLA	16	HASTRES	21	QQYYAVPQT	36
C17B243	KSSQSVLNSFDNKNDLA	17	EASTRES	25	QQHWQTPLT	37
C17B244	KSSQSVLSSITNVNDLA	18	TASTRES	26	QQYYHDPFT	38

Пример 3. Связывание антител к CCL17 с созревшей аффинностью с человеческим CCL17 и CCL17

яванского макака.

Антитела оценивали по их связыванию с человеческим CCL17 и CCL17 яванского макака с использованием равновесной аффинности в растворе (SEA). Методика для этих экспериментов была аналогична той, которая использовалась Haenel et al. (Haenel et al., Anal. Biochem. 339:182-184, 2005). Для получения комплексов антиген-антитело человеческий CCL17 или CCL17 яванского макака серийно разводили в солевом буфере на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, TBST (Thermo Scientific), в соотношении 1:6, с начальной концентрацией 2000000 пМ, в полипропиленовых планшетах с 96 глубокими лунками. Для получения смесей, содержащих серийное разведение хемокинов, начиная от конечной концентрации 1 мкМ и с постоянной концентрацией антитела к CCL17 (20 или 100 пМ), к каждому разведению хемокинов добавляли равные объемы моноклональных антител (mAb) к hCCL17 при 40 или 200 пМ. Смеси получали в двойном экземпляре и инкубировали при 4°C в течение 48 ч для достижения равновесия. Свободное антитело обнаруживали с использованием прибора SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Полученные кривые связывания сопоставляли для получения равновесной константы диссоциации (K_D) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.01) с использованием модели связывания 1:1 для выполнения нелинейного регрессионного анализа данных по методу наименьших квадратов. В табл. 5 показаны аффинности антител к человеческому CCL17 и CCL17 яванского макака. Диапазон аффинностей составлял от около 2 пМ до около 700 пМ для человеческого CCL17 и от около 200 пМ до около 9500 пМ для CCL17 яванского макака. Созданные антитела связывались с человеческим CCL17 с аффинностями от около 2- до около 150-кратно более высокими, чем при связывании с CCL17 яванского макака.

Таблица 5

Идентификатор mAb	Аффинность (пМ)		Кратность связывания с человеческим CCL17/CCL17 яванского макака
	Человеческий CCL17	CCL17 яванского макака	
C17F24 (исходный)	1000	Н/о*	
C17B234	2	230	115,0
C17B235	72	9497	131,9
C17B236	39	297	7,6
C17B237	657	3066	4,7
C17B238	115	1456	12,7
C17B239	92	630	6,8
C17B240	83	4596	55,4
C17B241	50	583	11,7
C17B242	167	384	2,3
C17B243	28	677	24,2
C17B244	33	565	17,1

*Не определено.

Пример 4. Оптимизация антител к CCL17.

Антитела C17B234 и C17B240 к CCL17 содержали потенциальный сайт N-связанного гликолизирования в начале LCDR2 (NAS). Остаток (N) аспарагина в положении 50 остатка (нумерация Кабат) из C17B234 мутировали до шести различных аминокислот (A, D, G, S, T и I).

Потенциальный мотив изомеризации аспарагиновой кислоты (DS) идентифицировали в HCDR3 в исходном C17F24 и всех его вариантах с созревшей аффинностью. Для анализа эффекта замен в этом положении остаток серина в положении 100с (нумерация Кабат) мутировали до A, T либо S или D в положении 100b мутировали до E в тяжелой цепи из C17B234 mAb. Полученные тяжелые цепи спаривали с легкой цепью из C17B258 mAb.

Антитела экспрессировали как IgG1 и измеряли их аффинность к человеческому CCL17 и CCL17 яванского макака. В табл. 6 и 7 показаны последовательности CDR тяжелой и легкой цепей оптимизированных антител. В табл. 8 показана аффинность антител к человеческому CCL17 и CCL17 яванского макака. Мутагенез N50 в легкой цепи привел к от 2- до 100-кратному улучшению связывания.

Таблица 6

Идентификатор MAb	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C17B257	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B258	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B260	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B262	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B263	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B264	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B293	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDAFDY	42
C17B294	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDTFDY	43
C17B295	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWESFDY	44

Таблица 7

Идентификатор MAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C17B257	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	AASTRES	39	QQFYVVPST	28
C17B258	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYVVPST	28
C17B260	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	GASTRES	22	QQFYVVPST	28
C17B262	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	SASTRES	40	QQFYVVPST	28
C17B263	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	TASTRES	26	QQFYVVPST	28
C17B264	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	IASTRES	41	QQFYVVPST	28
C17B293	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYVVPST	28
C17B294	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYVVPST	28
C17B295	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYVVPST	28

Таблица 8

Идентификатор MAb	Аффинность (пМ)		Кратность связывания с человеческим CCL17/CCL17 яванского макака
	Человеческий CCL17	CCL17 яванского макака	
C17B257	0,1	65,6	656,0
C17B258	0,1	41,6	416,0
C17B260	0,5	36,4	72,8
C17B262	0,3	55,5	185,0
C17B263	0,1	75,59	755,9
C17B264	0,4	71,83	179,6
C17B293	< 0,1	39	
C17B294	1	22	22,0
C17B295	175	29892	170,8

Остаток триптофана в HCDR3 в положении 100a (нумерация Кабат) в mAb из C17B236 идентифицирован как предполагаемый сайт нежелательного послетрансляционного окисления. Этот остаток мутировал до 17 других аминокислот (всех, кроме С и М) в исходном Fab C17B236, C17F319, которым является mAb. Для формирования этой панели осуществляли мутагенез по Кункелю с кодоном NNK или определяли олигонуклеотиды кодона. Впоследствии эти фрагменты Fab подвергали скринингу с использованием набора ИФА для рецептора-активатора NFκB для определения связывания как с биотинилированным человеческим CCL17, так и с CCL17 яванского макака. Пять вариантов (W → R, Y, F, T, I) демонстрировали некоторую степень связывания в ИФА связывания Fab (табл. 5). Три наилучших варианта конвертировали в mAb (M17B288, C17B289, C17B290) для экспрессии и MSD-SEA (табл. 6). Большинст-

во вариантов проявляло сниженную аффинность к человеческому CCL17 и CCL17 яванского макака. Последовательности VH и VL антител показаны в табл. 9.

Таблица 9

mAb	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
C17F24 (исходный)	45	49
C17B234	45	50
C17B235	45	51
C17B236	45	52
C17B237	45	53
C17B238	45	54
C17B239	45	55
C17B240	45	56
C17B241	45	57
C17B242	45	58
C17B243	45	59
C17B244	45	60
C17B257	45	61
C17B258	45	62
C17B260	45	63
C17B262	45	64
C17B263	45	65
C17B264	45	66
C17B293	46	62
C17B294	47	62
C17B295	48	62

Пример 6. Выбор константных областей.

Выбранные антитела клонировали как IgG2 или IgG4 со следующими заменами: S228P/L234A/L235A IgG4 или V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S IgG2, с использованием стандартных способов. В табл. 10 показаны полученные антитела.

Таблица 10

Название mAb	Изотип	Вариабельные области из mAb
C17B302	V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/ P331S IgG2	C17B293
C17B311	S228P/L234A/L235A IgG4	C17B293
C17B301	V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/ P331S IgG2	C17B294
C17B312	S228P/L234A/L235A IgG4	C17B294

Тяжелые и легкие цепи некоторых антител показаны ниже:

CB302 HC (SEQ ID NO: 67)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTR
YSPSFQGGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGPADVWDAFDYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPAAASSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSL
SPGK

CB302 LC (SEQ ID NO: 68)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDAST
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CB301 HC (SEQ ID NO: 69)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDS DTR
 YSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGPADVWDTFDYWGGQTLVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPGPCAPPAAASSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDNLN
 GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

CB301 LC (SEQ ID NO: 70)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDAST
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 7. Определение характеристик антител к CCL17.

Для оценки способности ингибировать биологическую активность CCL17 антитела к CCL17 характеризовали в потоке кальция, анализе репортера β -аррестина и анализе хемотаксиса.

Анализ потока кальция. Анализ мобилизации кальция использовали для тестирования способности mAb гибридомы нейтрализовать сигналинг CCL17. Клетки CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) выращивали в культуре в среде RPMI с GlutaMAX; 10% ФБС; 10 mM 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), 1 mM пирувата натрия, 4500 мг/л глюкозы и 1500 мг/мл бикарбоната натрия в инкубаторе при 37°C с 5% насыщением CO₂. Клетки метили красителем с использованием набора Fluo-8 NW No Wash Calcium Assay Kit (№ 36315) производства компании BD Bioquest, Inc. Тестовые антитела и 10 нг/мл человеческого CCL17 или 5 нг/мл CCL17 яванского макака предварительно инкубировали с тестовыми антителами и смесь добавляли к клеткам. Флуоресцентный сигнал обнаруживали с использованием FDSS 6000 (Hamamatsu, г. Бриджуотер, штат Нью-Джерси, США), применяя возбуждение 490 нм и эмиссию 525 нм.

Анализ по гену-репортеру β -аррестина. Анализ β -аррестина использовали для оценки способности антител к CCL17 нейтрализовать функцию CCL17. Анализ выполняли с использованием анализа β -аррестина PathHunter express (DiscoverX). Коротко, способность антител к CCL17 ингибировать CCL17-индуцированное рекрутирование β -аррестина оценивали в клетках Hek293, совместно экспрессирующих CCR4, слитый в каркасе с малым фрагментом ProLink™ фермента, и слитный белок β -аррестина и мутантную N-терминальную делецию β -gal (называется акцептором фермента, или EA). Антитела к CCL17 в различных концентрациях (0,15 нМ - 1 мкМ) соединяли с 20 нМ CCL17, и смесь инкубировали при 37°C в течение 20-30 мин перед добавлением комплекса антитело-CCL17 к клеткам. Впоследствии смесь наносили на клетки и инкубировали при 37°C (95% O₂/5% CO₂) в течение 90 мин. В каждую лунку добавляли 55 мкл проявляющего реагента и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Пробы считывали на стандартном спектрофотометре для прочтения люминесцентных планшетов и вычисляли величины IC₅₀.

Анализ хемотаксиса. Анализ хемотаксиса использовали для демонстрации того, что антитела к CCL17 ингибируют функцию CCL17. Миграцию клеток HSC-F (клетки HSC-F получали из источника реагентов от нечеловекообразных приматов Национального института здравоохранения (NIH Nonhuman Primate Reagent Resource) или клеток CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) оценивали с использованием 96-луночной камеры для хемотаксиса с использованием поликарбонатного фильтра 5 мкм в соответствии с протоколом, описанным в Imai et al. 1997; Imai et al. 1999. Коротко, нижние камеры заполняли по 320 мкл 0,1% RPMI/BSA и 1 нМ человеческого CCL17 или CCL17 яванского макака без применения различных концентраций антител или с их использованием (0,125; 0,25; 0,5; 1 и 10 мкг/мл) и далее осторожно покрывали поликарбонатной мембраной. Клетки промывали PBS и суспендировали в RPMI/BSA 0,1% по 0,5×10⁶ клеток/мл и в верхние камеры добавляли клеточную суспензию. Камеры инкубировали в течение 60 мин в увлажненном 5% CO₂ инкубаторе при 37°C и определяли клетки, мигрирующие в нижнюю ка-

меру через мембрану, с использованием анализа жизнеспособных люминесцентных клеток Cell Titer-Glo.

В табл. 11 показаны значения IC_{50} для анализа потока кальция. Данные являются средним показателем трех независимых экспериментов. Каждое mAb полностью нейтрализовало поток кальция, индуцированный человеческим CCL17 или CCL17 яванского макака при использовании либо 10 нг/мл (1,25 нМ) человеческого CCL17, либо 5 нг/мл (0,625 нМ) CCL17 яванского макака, и, как показано в табл. 11, величины IC_{50} были приблизительно эквивалентны для каждого антитела как к белку человека, так к белку яванского макака.

Таблица 11

mAb	IC_{50} (нМ)	
	Человеческий CCL17	CCL17 яванского макака
C17B302	0,593	0,238
C17B311	0,553	0,239
C17B318	0,275	0,237
C17B319	0,753	0,289
C17B234	0,421	0,369
C17B235	0,558	0,919
C17B236	0,385	0,349
C17B237	0,882	0,549
C17B238	0,387	0,348
C17B239	0,427	0,430
C17B240	0,405	0,308
C17B241	0,456	0,339
C17B242	0,483	0,340
C17B243	0,231	0,310
C17B244		0,311

В табл. 12 показаны значения IC_{50} для анализа β -аррестина. Данные являются средним показателем трех независимых экспериментов. Все mAb были способны полностью ингибировать рекрутирование β -аррестина, индуцированное человеческим CCL17 или CCL17 яванского макака, при 20 нМ и дозозависимо ингибировать рекрутирование β -аррестина, индуцированное человеческим CCL17 или CCL17 яванского макака, с эквивалентной силой.

Таблица 12

	Человеческий CCL17		CCL17 яванского макака	
	IC_{50} (нМ)	Станд.	IC_{50} (нМ)	Станд.
C17B302	13,94	9,56	13,412	6,403
C17B311	10,65	2,89	10,324	2,569
C17B318	11,006	2,886	12,141	2,294
C17B319	14,225	4,133	17,51	6,605
C17B234	8,42	5,525	5,391	0,0431
C17B236	6,98	3,33	9,502	0,073

На Фиг. 1 и 2 показано ингибирование хемотаксиса выбранными антителами в клетках человека и яванского макака соответственно. Все протестированные антитела ингибировали индуцированный человеческим CCL17 хемотаксис клеток CCRF-CEM с уровнем ингибирования около 50% при концентрации антител 0,5 мкг/мл. C17B302 и C17B311 ингибировали хемотаксис клеток HSC-F яванского макака, индуцированный CCL17 яванского макака, с уровнем ингибирования около 50% при концентрации антител 0,5 мкг/мл.

Пример 8. Картирование эпитопов антитела C17B236 к CCL17.

Связывающий эпитоп антитела C17B2 36 (VH: SEQ ID NO: 45; VL: SEQ ID NO: 52) определяли с помощью рентгенокристаллографии.

Человеческий CCL17 экспрессировали в *E.coli*, выделяли из телец включения и выполняли рефолдинг. Фрагмент Fab из C17B2 36 mAb экспрессировали в клетках HEK293F. CCL17: комплекс C17B236

получали путем смешивания излишка CCL17 в молярном соотношении 1,6:1. Впоследствии комплекс очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Комплекс кристаллизовали из раствора, содержащего 20% PEG 3350 и 0,2 М тартрата K/Na, способом диффузии пара. Данные рентгенологической дифракции собирали до разрешения 1,9 Å. Структуру определяли с помощью молекулярной замены и очищали от примесей с фактором R 18,0%.

Эпитоп C17B236 является конформационным и охватывает 3 сегмента молекулы CCL17, а именно, две петли (остатки 21-23 и 44-45) и С-терминальную спираль (остатки 60-68). Ключевые взаимодействия включают основные остатки Arg22 и Lys23 из CCL17 и кластер кислотных остатков в HCDR2, включая Asp52, Asp55 и Asp57. В дополнение к этим электростатическим взаимодействиям в центре эпитопа между Trp33 и Trp105 из VH и Arg22 и CCL17 возникают контакты Ван-дер-Ваальса. Учитывая количество контактов, ключевым остатком эпитопа является Arg22, который стыкуется с Trp33 из VH и создает множество контактов с HCDR3. Остатки паратопа и эпитопа показаны на фиг. 7.

Паратоп (остатки антитела, участвующие в связывании с CCL17) включает 18 остатков, которые относятся к 5 из 6 CDR (все, кроме LCDR2).

Эпитоп C17B236 находится на противоположной стороне от поверхности димеризации мономера CCL17. Таким образом, C17B236 блокирует димеризацию CCL17. Эффект нейтрализации C17B236 происходит от конкуренции с CCR4 за перекрывающиеся эпитопы.

Последовательности

SEQ ID NO	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Homo sapiens	CCL17	argtnvgrecclcyfkgaiplr lktwyqtsedcsrdaivfvtvqg raicsdpnnkrvknvksylsle rs
2	PRT	Яванский макак	CCL17	margtnvgrecclkyfkgaiplr klktwyqtsedcsrdaivfvtvq nkaicsdpndkkvkkalkylqsl ers
3	PRT	Яванский макак	CCL22	gpyganmedsvccrdyvryrmp rvvkhfywtsdscprpgvllts rdkeicadprvpwvkmilnksq
4	PRT	Искусственная последовательность	HCDR1 из C17F24	SYWIG
5	PRT	Искусственная последовательность	HCDR2 из C17F24	IIDPSDSDTRYSPSFQG
6	PRT	Искусственная последовательность	HCDR3 из C17F24	VGPADVWDSFDY
7	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17F24 (исходный)	KSSQSVLYSSNNKNYLA
8	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B234	KSSQSVLLSFDNINKLA
9	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B235	KSSQSVLYSFYNFNALA
10	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B236	KSSQSVLLSPWNSNQLA
11	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B237	KSSQSVLTSYNNSNYLA
12	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B238	KSSQSVLISAFNQNPALA
13	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B239	KSSQSVLSSFTNTNTLA

14	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B240	KSSQSVLYSHVNYNALA
15	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B241	KSSQSVLNSFTNNNALA
16	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B242	KSSQSVLFSDNLNTLA
17	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B243	KSSQSVLNSFDNKNDLA
18	PRT	Искусственная последовательность	LCDR1 из C17B244	KSSQSVLSSITNVNDLA
19	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17F24 (исходный)	WASTRES
20	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17B234	NASTRES
21	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17B235	HASTRES
22	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17B236	GASTRES
23	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17B237	LASTRES
24	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17B238	DASTRES
25	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17B241	EASTRES
26	PRT	Искусственная последовательность	LCDR2 из C17B244	TASTRES
27	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17F24 (исходный)	QQYYSTPLT
28	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B234	QQFYSPST
29	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B235	QQFYATPFT

30	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B236	QQYYLIPST
31	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B237	QQYLSPPST
32	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B238	QQYQFIPFT
33	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B239	QQYLIYPST
34	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B240	QQYYTLPAT
35	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B241	QQTNSIPLT
36	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B242	QQYYAVPQT
37	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B243	QQHWQTPLT
38	PRT	Искусственная последовательность	LCDR3 из C17B244	QQYYHDPFT
39	PRT		LCDR2 из C17B257	AASTRES
40	PRT		LCDR2 из C17B262	SASTRES
41	PRT		LCDR2 из C17B264	IASTRES
42	PRT		HCDR3 из C17B293	VGPADVWDAFDY
43	PRT		HCDR3 из C17B294	VGPADVWDTFDY
44	PRT		HCDR3 из C17B295	VGPADVWESFDY

45	PRT	Homo sapiens	VH из C17F24, C17B234, C17B235, C17B236, C17B237, C17B238, C17B239, C17B240, C17B241, C17B242, C17B243, C17B244, C17B257, C17B258, C17B260, C17B262, C17B266, C17B264	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE WMGIIDPSDSDTRYSPSFQGQVT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARVGPADVWDSFDYWGQGT LVTVSS
46	PRT	Homo sapiens	VH из C17M293	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE WMGIIDPSDSDTRYSPSFQGQVT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARVGPADVWDAFDYWGQGT LVTVSS
47	PRT	Homo sapiens	VH из C17B294	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE WMGIIDPSDSDTRYSPSFQGQVT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARVGPADVWDTFDYWGQGT LVTVSS

48	PRT	Homo sapiens	VH из C17B295	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE WMGIIDPSDSSTRYSPSFQGGVT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARVGPADVWESFDYWGQGT LVTVSS
49	PRT	Homo sapiens	VL из C17F24 (исходный)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK
50	PRT	Homo sapiens	VL из C17B234	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYNASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
51	PRT	Homo sapiens	VL из C17B235	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLYSFYNFNALAWYQQKP GQPPKLLIYHASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYATPFTFGQGTKVEIK
52	PRT	Homo sapiens	VL из C17B236	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSPWNSNQLAWYQQKP GQPPKLLIYGASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYLIPSTFGQGTKVEIK
53	PRT	Homo sapiens	VL из C17B237	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLTSYNNSNYLAWYQQKP GQPPKLLIYLASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYLSPSTFGQGTKVEIK

54	PRT	Homo sapiens	VL № C17B238	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLISAFNQNP LAWYQQKP GQPPKLLIYDASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYQFIPFTFGQGTKVEIK
55	PRT	Homo sapiens	VL № C17B239	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLSSFTNTNTLAWYQQKP GQPPKLLIYHASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYLIYPSTFGQGTKVEIK
56	PRT	Homo sapiens	VL № C17B240	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLYSHVNYNALAWYQQKP GQPPKLLIYNASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYTLPATFGQGTKVEIK
57	PRT	Homo sapiens	VL № C17B241	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLNSFTNNALAWYQQKP GQPPKLLIYEASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQTNSIPLTFGQGTKVEIK
58	PRT	Homo sapiens	VL № C17B242	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLFSDNLNTLAWYQQKP GQPPKLLIYHASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYAVPQTFGQGTKVEIK
59	PRT	Homo sapiens	VL № C17B243	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLNSFDNKNDLAWYQQKP GQPPKLLIYEASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQHWQTPLTFGQGTKVEIK
60	PRT	Homo sapiens	VL № C17B244	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLSSITNVNDLAWYQQKP GQPPKLLIYTASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYHDPFTFGQGTKVEIK

61	PRT	Homo sapiens	VL нз C17B257	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYAASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
62	PRT	Homo sapiens	VL нз C17B258	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYDASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
63	PRT	Homo sapiens	VL нз C17B260	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYGASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
64	PRT	Homo sapiens	VL нз C17B262	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYSASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
65	PRT	Homo sapiens	VL нз C17B263	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYTASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
66	PRT	Homo sapiens	VL нз C17B264	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYIASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIK

67	PRT	Homo sapiens	CB302 HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPKGLE WMGIIDPSDSDTRYSPSFQGQVT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYFCARVGPADVWDAFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVERKCCVECPPC PAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVELTVLHQLDNLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPMLDSGSEFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
68	PRT	Homo sapiens	CB302 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYDASTRESGVDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

69	PRT	Homo sapiens	CB301 HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE WMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGVT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARVGPADVWDTFDYWGGGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVKCCVECPPC PAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSAEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
70	PRT	Homo sapiens	CB301 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKP GQPPKLLIYDASTRESGVDPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQFYSPSTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, специфически связывающееся с CCL17 человека, содержащее варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL), причем

VH содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3), и

VL содержит определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3),

причем HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат:

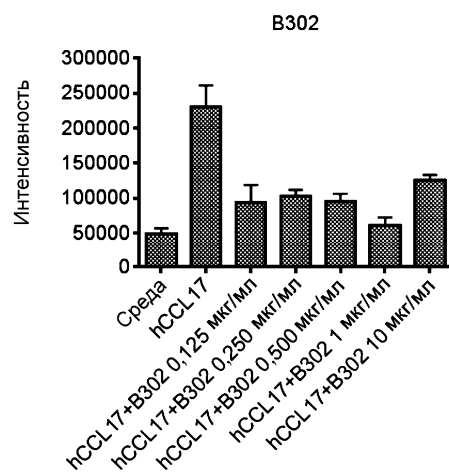
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 8, 20 и 28 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 9, 21 и 29 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 10, 22 и 30 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, 21 и 33 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 14, 20 и 34 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 15, 25 и 35 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 17, 25 и 37 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 6, 18, 26 и 38 соответственно;
- SEQ ID NO:4, 5, 42, 8, 24 и 28 соответственно; или
- SEQ ID NO:4, 5, 43, 8, 24 и 28 соответственно.

2. Антитело по п.1, которое связывается с CCL17 человека, по меньшей мере, в пределах аминокислотных остатков CCL17 21-23, 44-45 и 60-68 с SEQ ID NO:1.

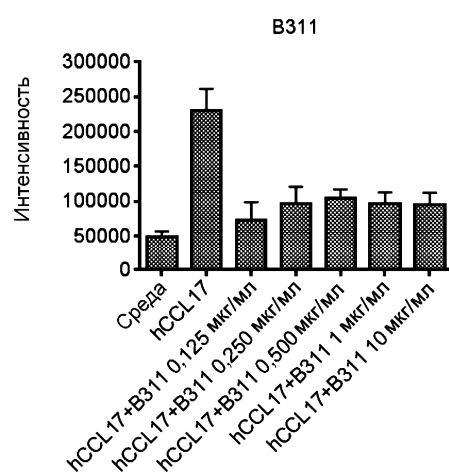
3. Антитело по п.2, которое связывается с CCL17 человека, по меньшей мере, по остаткам R22 и

K23 с SEQ ID NO:1.

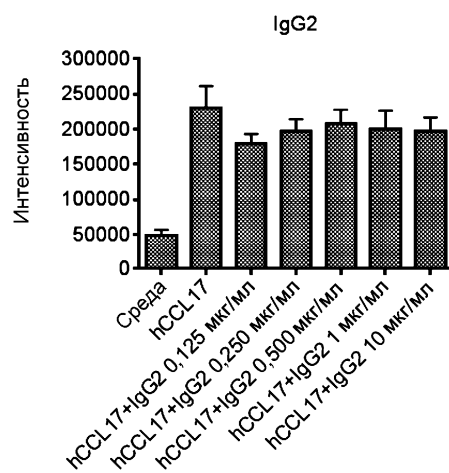
4. Антитело по п.1, которое блокирует взаимодействие CCL17/CCR4.
5. Антитело по п.4, которое связывается с CCL17 человека с константой аффинности (K_D) около 1×10^{-10} М или менее при измерении K_D с использованием равновесной аффинности в растворе солевого буфера на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, после совместной инкубации антитела и CCL17 человека в течение 48 ч при 4°C.
6. Антитело по п.5, которое связывается с CCL17 человека с K_D около 5×10^{-12} М или менее.
7. Антитело по любому из пп.1-6, которое связывается с CCL17 яванского макака (*Macaca fascicularis*) с K_D около 1×10^{-8} М или менее при измерении K_D с использованием равновесной аффинности в растворе солевого буфера на основе Трис, содержащем 0,05% Tween-20, после совместной инкубации антитела и CCL17 яванского макака в течение 48 ч при 4°C.
8. Антитело по любому из пп.1-7, которое ингибирует эффект зависимой внутриклеточной мобилизации кальция под действием CCL-17 в количестве 10 нг/мл в клетках CCRF-CEM, измеряемую с использованием Fluo-8 NW со значением IC_{50} около 1×10^{-9} М или менее.
9. Антитело по любому из пп.1-8, содержащее VH и VL с SEQ ID NO:46 и SEQ ID NO:62, соответственно, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 5, 42, 8, 24 или 28, соответственно.
10. Антитело по любому из пп.1-8, где VH содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:45, 46 или 47.
11. Антитело по любому из пп.1-8, где VL содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60 или 62.
12. Антитело по любому из пп.1-8, где антитело содержит:
 - a) VH с SEQ ID NO:45 и VL с SEQ ID NO:50, 51, 52, 55, 56, 57, 59 или 60;
 - b) VH и VL с SEQ ID NO:46 и 62 соответственно; или
 - c) VH и VL с SEQ ID NO:47 и 62 соответственно.
13. Антитело по п.9, которое содержит VH с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична VH с SEQ ID NO:46, и VL с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична VL с SEQ ID NO:62.
14. Антитело по любому из пп.1-13, которое является человеческим или гуманизированным.
15. Антитело по п.14, которое имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
16. Антитело по п.15, которое содержит замену в области Fc.
17. Антитело по п.16, в котором замена выбрана из замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S или P331S на IgG2 или из замены S228P, L234A или L235A на IgG4, причем нумерация остатков соответствует индексу ЕС.
18. Антитело по п.17, в котором замена выбрана из замены V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S на IgG2 или из замены S228P/L234A/L235A на IgG4, причем нумерация остатков соответствует индексу ЕС.
19. Фармацевтическая композиция для лечения CCL17-опосредованного заболевания, содержащая антитело по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель.
20. Выделенный полинуклеотид, кодирующий VH и VL антитела по любому из пп.9-18.
21. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.20.
22. Клетка-хозяин для продукции выделенного антитела, содержащая вектор по п.21.
23. Способ получения антитела по пп.1-18, включающий культивирование клетки-хозяина по п.22 в условиях, обеспечивающих образование антитела.
24. Способ лечения CCL17-опосредованного заболевания, включающий введение антитела по любому из пп.1-18 индивиду.
25. Способ по п.24, в котором CCL17-опосредованное заболевание представляет собой воспалительное заболевание.
26. Способ по п.25, в котором воспалительное заболевание представляет собой бронхиальную астму, язвенный колит (ЯК), атопический дерматит (АД) или идиопатический легочный фиброз (ИЛФ).
27. Способ лечения бронхиальной астмы или гиперреактивности дыхательных путей, включающий введение антитела по любому из пп.1-18 индивиду.
28. Применение антитела по любому из пп.1-18 для получения лекарственного средства для лечения CCL17-опосредованного заболевания.
29. Применение по п.28, в котором CCL17-опосредованное заболевание представляет собой воспалительное заболевание.
30. Применение по п.29, в котором воспалительное заболевание представляет собой бронхиальную астму, язвенный колит (ЯК), атопический дерматит (АД) или идиопатический легочный фиброз (ИЛФ).



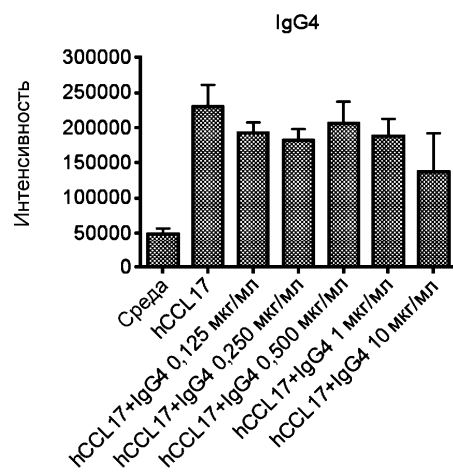
Фиг. 1А



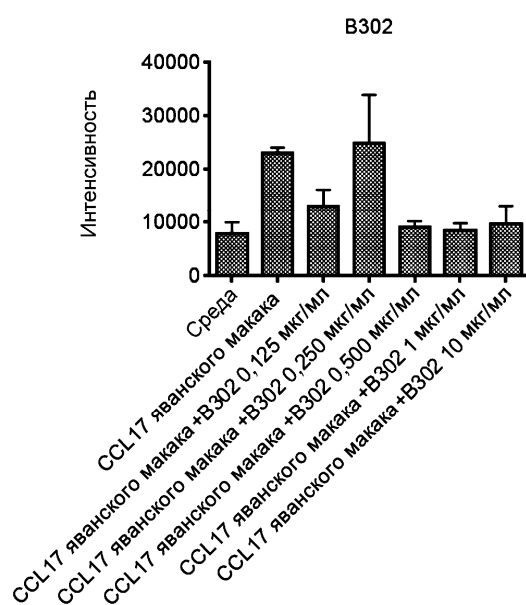
Фиг. 1В



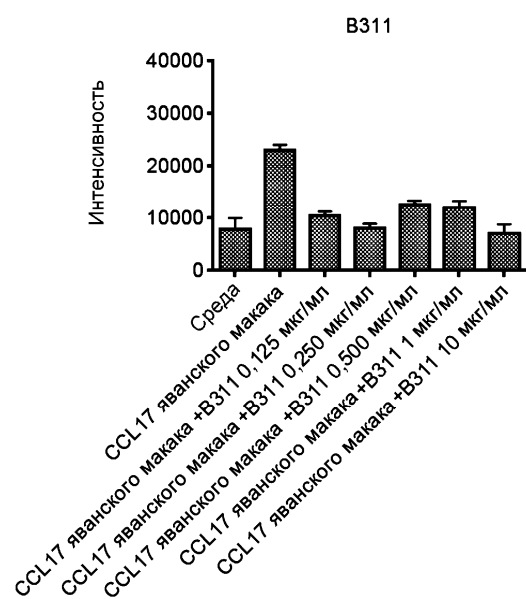
Фиг. 1С



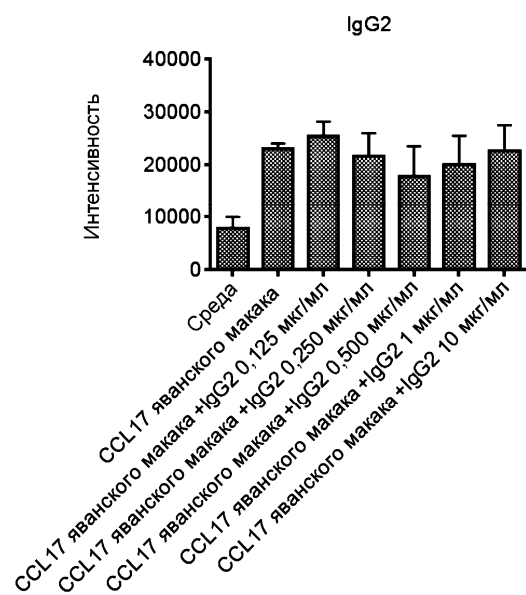
Фиг. 1D



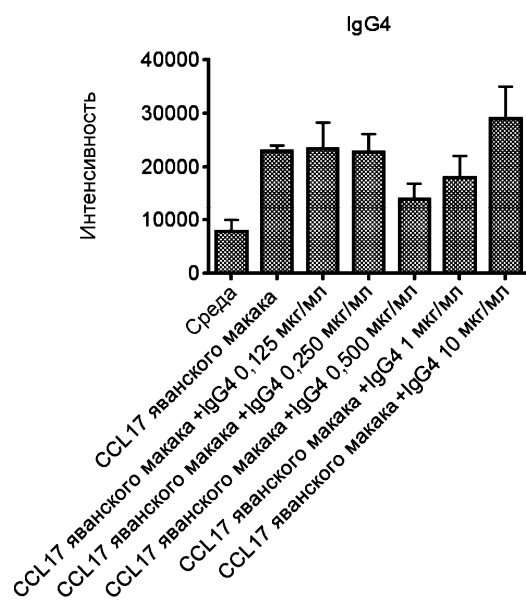
Фиг. 2A



Фиг. 2B



Фиг. 2С



Фиг. 2D

	1	30
C17B234_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B235_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B236_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B239_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B240_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B241_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B243_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B244_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B293_VH_46	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B294_VH_47	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	

	31	60
C17B234_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B235_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B236_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B239_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B240_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B241_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B243_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B244_VH_45	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B293_VH_46	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	
C17B294_VH_47	SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSSTRY	

	61	90
C17B234_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B235_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B236_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B239_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B240_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B241_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B243_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B244_VH_45	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B293_VH_46	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B294_VH_47	SPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASD	

	91	121
C17B234_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B235_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B236_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B239_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B240_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B241_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B243_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B244_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B293_VH_46	TAMYYCARVGPADVWDAFDYWGQGLVTVSS	
C17B294_VH_47	TAMYYCARVGPADVWDTFDYWGQGLVTVSS	

Фиг. 3

VH консенсусная последовательность (SEQ ID NO: 75)
 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDT
 RYSPSFQGGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGPADVWDX₁FDYWGGGT
 LVTVSS

где

X₁ представляет собой S, A или T

HCDR1 последовательность

SYWIG (SEQ ID NO: 4)

HCDR2 последовательность

IIDPSDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 5)

HCDR3 консенсусная последовательность

VGPADVWDX₁FDY (SEQ ID NO: 71),

где

X₁ представляет собой S, A или T

Фиг. 4

	1	30
C17B234_VL_50	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B235_VL_51	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B236_VL_52	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B239_VL_55	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B240_VL_56	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B241_VL_57	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B243_VL_59	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B244_VL_60	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B293_VL_62	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B294_VL_62	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	

	31	60
C17B234_VL_50	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYNASTR	
C17B235_VL_51	YSFYNFNALAWYQQKPGQPPKLLIYHASTR	
C17B236_VL_52	LSPWNSNQLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR	
C17B239_VL_55	SSFTNTNTLAWYQQKPGQPPKLLIYHASTR	
C17B240_VL_56	YSHVNYNALAWYQQKPGQPPKLLIYNASTR	
C17B241_VL_57	NSFTNNNALAWYQQKPGQPPKLLIYEASTR	
C17B243_VL_59	NSFDNKNDLAWYQQKPGQPPKLLIYEASTR	
C17B244_VL_60	SSITNVNDLAWYQQKPGQPPKLLIYTASTR	
C17B293_VL_62	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDASTR	
C17B294_VL_62	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDASTR	
	* * * ***** *	

	61	90
C17B234_VL_50	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B235_VL_51	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B236_VL_52	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B239_VL_55	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B240_VL_56	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B241_VL_57	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B243_VL_59	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B244_VL_60	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B293_VL_62	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B294_VL_62	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	

	91	113
C17B234_VL_50	VYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK	
C17B235_VL_51	VYYCQQFYATPFTFGQGTKVEIK	
C17B236_VL_52	VYYCQQYYLIPSTFGQGTKVEIK	
C17B239_VL_55	VYYCQQYLIYPSTFGQGTKVEIK	
C17B240_VL_56	VYYCQQYYTLPATFGQGTKVEIK	
C17B241_VL_57	VYYCQQTNSIPLTFGQGTKVEIK	
C17B243_VL_59	VYYCQQHWQTPLTFGQGTKVEIK	
C17B244_VL_60	VYYCQQYYHDPFTFGQGTKVEIK	
C17B293_VL_62	VYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK	
C17B294_VL_62	VYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK	
	***** * *****	

Фиг. 5

VL консенсусная последовательность (SEQ ID NO: 76):
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LAWYQQKPGQPPLLIY
 X₆ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQX₇X₈X₉X₁₀PX₁₁TFGQGT
 KVEIK; где

- X₁ представляет собой L, Y, S или N;
- X₂ представляет собой F, P, H или I;
- X₃ представляет собой D, Y, W, T или V;
- X₄ представляет собой I, F, S, T, Y, N, K или V;
- X₅ представляет собой K, A, Q, T или D;
- X₆ представляет собой N, H, G, E, T или D;
- X₇ представляет собой F, Y, T или H;
- X₈ представляет собой Y, L, N или W;
- X₉ представляет собой S, A, L, I, T, Q или H;
- X₁₀ представляет собой V, T, I, Y, L или D; и
- X₁₁ представляет собой S, F, A или L.

Фиг. 6А

LCDR1 консенсусная последовательность:

KSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LA (SEQ ID NO: 72),

где

X₁ представляет собой L, Y, S или N;

X₂ представляет собой F, P, H или I;

X₃ представляет собой D, Y, W, T или V;

X₄ представляет собой I, F, S, T, Y, N, K или V; и

X₅ представляет собой K, A, Q, T или D;

LCDR2 консенсусная последовательность:

X₁ASTRE (SEQ ID NO: 73),

где

X₁ представляет собой N, H, G, E, T или D.

LCDR3 консенсусная последовательность:

QQX₁X₂X₃X₄PX₅T (SEQ ID NO: 74);

где

X₁ представляет собой F, Y, T или H;

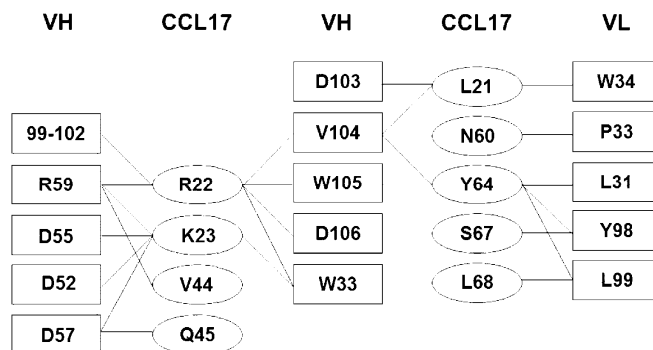
X₂ представляет собой Y, L, N или W;

X₃ представляет собой S, A, L, I, T, Q или H;

X₄ представляет собой V, T, I, Y, L или D; и

X₅ представляет собой S, F, A или L.

Фиг. 6B



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2