



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.03.20

(21) Номер заявки

201171148

(22) Дата подачи заявки

2010.03.16

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО-АНТАГОНИСТ, СПЕЦИФИЧНОЕ ДЛЯ ГЕТЕРОДИМЕРА АЛЬФА4БЕТА7

(31) **61/162,154; 61/306,829**

(32) **2009.03.20; 2010.02.22**

(33) **US**

(43) **2012.04.30**

(86) **PCT/US2010/027422**

(87) **WO 2010/107752 2010.09.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Хсу Хайлин (US), Фолтц Ян (CA),
Арора Таруна, Джекобсен Фредерик У.
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-0178779**

RUTGEERTS P. ET AL.: "Biological Therapies for Inflammatory Bowel Diseases", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA LNKD-DOI:10.1053/J.GASTRO.2009.02.001, vol. 136, no. 4, 26 February 2009 (2009-02-26), pages 1182-1197, XP026070050, ISSN: 0016-5085 [retrieved on 2009-02-26], the whole document

FEAGAN B.G. ET AL.: "Treatment of Active Crohn's Disease With MLN0002, a Humanized Antibody to the alpha4beta7 Integrin", CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, AMERICAN GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION, US LNKD-DOI:10.1016/J.CGH.2008.06.007, vol. 6, no. 12, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 1370-1377, XP025872069, ISSN: 1542-3565 [retrieved on 2008-10-01], the whole document

WO-A2-9806248

WO-A2-2006017538

TIDSWELL M. ET AL.: "Structure-function analysis of the integrin beta7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 159, no. 3, 1 August

1997 (1997-08-01), pages 1497-1505, XP002200150, ISSN: 0022-1767, the whole document

SCHWEIGHOFFER T. ET AL.: "SELECTIVE EXPRESSION OF INTEGRIN ALPHA4BETA7 ON A SUBSET OF HUMAN CD4+ MEMORY T CELLS WITH HALLMARKS OF GUT-TROPHISM", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 151, no. 2, 15 July 1993 (1993-07-15), pages 717-729, XP002048550, ISSN: 0022-1767, the whole document

WO-A2-2005067620

GREEN L.L.: "Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B. V. AMSTERDAM, NL LNKD-DOI:10.1016/S0022-1759(99)00137-4, vol. 231, no. 1-2, 10 December 1999 (1999-12-10), pages 11-23, XP004187631, ISSN: 0022-1759, the whole document

RUDIKOFF S. ET AL.: "Single aminoacid substitution altering antigen-binding specificity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US LNKD-DOI:10.1073/PNAS.79.6.1979, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, the whole document

SOLER DULCE ET AL.: "The Binding Specificity and Selective Antagonism of Vedolizumab, an Anti-alpha(4)beta(7) Integrin Therapeutic Antibody in Development for Inflammatory Bowel Diseases", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US LNKD-DOI:10.1124/JPET.109.153973, vol. 330, no. 3, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 864-875, XP009134512, ISSN: 0022-3565 [retrieved on 2009-06-09], the whole document

WO-A2-02076406

US-A1-2008299129

WO-A1-0127279

WO-A2-2004016769

(57) Рассмотрены выделенные антигенсвязывающие белки, специфичные для гетеродимера альфа4бета7; выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая указанные антигенсвязывающие белки; вектор, включающий указанную нуклеиновую кислоту; выделенная клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная указанным вектором. Также описаны способ получения указанного антигенсвязывающего белка; фармацевтическая композиция для ингибирования по меньшей мере одной активности альфа4бета7, включающая указанный

антигенсвязывающий белок; способ ингибирования по меньшей мере одной активности альфа4бета7 и способ ингибирования адгезии клеток, экспрессирующих альфа4бета7, к тканям, содержащим клетки, экспрессирующие MAdCAM-1, включающие приведение в контакт клетки, экспрессирующей альфа4бета7, с указанным антигенсвязывающим белком, специфичным для гетеродимера альфа4бета7; а также способ лечения индивидуума, имеющего состояние, которое характеризуется несоответствующим транспортом клеток, экспрессирующих альфа4бета7, в ткани, включая клетки, которые экспрессируют MAdCAM-1, где указанный способ включает введении индивидууму указанной фармацевтической композиции.

Ссылки на родственные заявки

Для заявки на настоящий патент испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. 119(e) по заявке на патент США № 61/162154, поданной 20 марта 2009 г., и по заявке на патент США № 61/306829, поданной 22 февраля 2010 г., которые включены в настоящее описание посредством ссылок.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение представляет композиции и способы, относящиеся к антигенсвязывающим белкам, специфичным для гетеродимера альфа4бета7.

Предпосылки создания изобретения

Интегрины представляют собой гетеродимерные трансмембранные белки типа 1, образованные из двух субъединиц (одной альфа-субъединицы и одной бета-субъединицы), которые вовлекаются во множество различных взаимодействий по типу клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс. Функционально, как было показано, интегрины вовлекаются в различные биологические процессы, включающие миграцию лейкоцитов, рециркуляцию и иммунный ответ. У млекопитающих известно 18 альфа-субъединиц и восемь бета-субъединиц, которые объединяются с образованием 24 разных интегринов. Специфичность для лиганда определяется в основном конкретными сочетаниями экспрессируемых альфа- и бета-субъединиц, тогда как аффинность для лиганда модулируется конформационными изменениями интегринов и зависит от двухвалентных катионов.

Лиганды для интегринов формируют структурно разнородные группы, которые включают белки внеклеточного матрикса, такие как коллагены, фибронектин, витронектин и ламинины; контррецепторы, такие как молекулы клеточной адгезии (например, молекула адгезии клеток сосудистого эндотелия, или VCAM) и плазматические белки. Различные патогенные микроорганизмы также используют интегрины для запуска инфекции или в качестве сайтов для связывания токсинов. Структурно различающиеся лиганды, которые содержат одинаковые выступающие остатки глутаминовой или аспарагиновой кислот, обычно представлены в виде расширенной гибкой петли, которая важна для распознавания интегринами.

Интегрины альфа4 (альфа4 интегрины, функционирующие в тандеме с бета1 или бета7 субъединицей) играют важную роль в иммунной системе. Альфа4бета1 экспрессируются на лимфоцитах и миелоидных клетках; по всей видимости, они являются основным связывающим звеном для молекулы адгезии сосудистого эндотелия (VCAM). VCAM широко экспрессируется в сосудистом эндотелии и подвергается позитивной регуляции в процессе воспаления, связывая с альфа4бета7, а также с альфа4бета1 (хотя и слабее, чем с альфа4бета7). Альфа4бета7, обнаруженные также в периферических Т-клетках, В-клетках, NK-клетках и эозинофилах, экспрессируются на максимальном уровне в субпопуляции CD4+CD45RA Т-клеток памяти, которые, как было показано, находятся преимущественно в кишке. Основным лигандом для гетеродимера альфа4бета7 является молекула адгезии клеток слизистого эндотелия-1 (MAdCAM-1 или MAdCAM), экспрессируемая в эндотелии кишки.

Бета7 субъединица, помимо связывания с альфа4 цепью, выполняет также функцию партнера для альфаЕ с образованием в этом случае альфаЕбета7, который преимущественно экспрессируется на внутриэпителиальных лимфоцитах (IEL) в кишечнике, легких и мочеполовом тракте. АльфаЕбета7 также экспрессируется на дендритных клетках в кишке. Гетеродимер альфаЕбета7 связывается с Е-кадгеринном и экспрессируется на эпителиальных клетках. Считается, что IEL-клетки функционируют в рамках механизма иммунологического надзора в эпителиальном компартменте.

Антитела, которые связываются с альфа4 и ингибируют связывание альфа4бета1 с VCAM-1 и фибронектином, были картированы на участке из 52 аминокислот в альфа4, между остатками 152 и 203 (Schiffer et al., J. Biol. Chem. 270:14270; 1995). Tidswell et al. (J. Immunol. 159:1497; 1997) идентифицировали домены бета7, важные для связывания с MAdCAM-1, с использованием в своих исследованиях панели антител, которые связываются с бета7, в рамках стратегии, основанной на использовании химерных мышиных/человеческих субъединиц бета7. Указанные авторы обнаружили, что шесть из семи антител, которые ингибировали связывание с MAdCAM-1 и Е-кадгеринном, картируются на участке, включающем аминокислоты 176-250, которые, по всей видимости, обладают гомологией с сайтом адгезии, зависимым от иона металла (MIDAS), из других субъединиц интегрина. Одним из антител, использованных Tidswell et al., было специфичное для гетеродимера альфа4бета7 антитело, обозначенное как АСТ-1.

Антитело АСТ-1 было первоначально описано Lazarovitz et al. (J. Immunol. 133:1857; 1984) как антитело, образующееся у иммунизированных мышей при введении им Т-лимфоцитарной линии из МКПК (РВМС), специфичной для токсоида столбняка человека. Позже было показано, что АСТ-1 специфически связывается с гетеродимером альфа4бета7 (Schwighoffer et al., J. Immunol. 151:717, 1993). Несмотря на то, что АСТ-1 не связывается с мышиным альфа4бета7, это антитело связывается с альфа4бета7 по меньшей мере из некоторых видов приматов, отличных от человека, и, как было показано, аттенуируют спонтанный колит у хохлатых тамаринов в неволе (Hesterberg et al., Gastroenterology 111:1373; 1996).

Антитело АСТ-1 подвергли процедуре гуманизации и затем оценили его свойства в качестве терапевтического средства для лечения язвенного колита у человека (Feagan et al., N Engl J Med. 352:2499; 2005), а в недавнем времени и для лечения болезни Крона (Feagan et al., Clinical Gastroenterology и Hepatology, 6:1370, 2008). Гуманизированное антитело АСТ-1, также известное как ведолизумаб, описано в

WO 98/06248, а также в патенте США № 714785 и в WO 07/061679 и US 2007-0122404. Другое гуманизированное антитело, натализумаб (Tysabri®), использовали для лечения болезни Крона. Натализумаб представляет собой гуманизированную версию мышинового антитела, специфичного для альфа4. Ведолизумаб, как было показано, приводит к нейтрализации реакции против гуманизированного антитела у части пациентов, а натализумаб ассоциирован с прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатией (PML), представляющей собой неврологическое заболевание, связанное с реактивацией предшествующей инфекции вирусом JC у индивидуумов со сниженным иммунитетом. Соответственно, имеется потребность в терапевтическом средстве, которое бы ослабляло эти проявления посредством воздействия на метаболический путь, относящийся к альфа4бета7/MAdCAM-1.

Сущность изобретения

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с альфа4бета7 (т.е. с антигенсвязывающим белком, специфичным для гетеродимера альфа4бета7). В другом аспекте осуществления настоящего изобретения, антигенсвязывающий белок специфически связывается с альфа4бета7 из примата, отличного от человека, яванского макака, шимпанзе, млекопитающего, отличного от приматов, грызунов, мыши, крысы, хомяка, морской свинки, кошки или собаки. В другом аспекте осуществления настоящего изобретения, выделенный антигенсвязывающий белок включает человеческое антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, рекомбинантное антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело, тетратело, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, домен-специфическое антитело, IgD-антитело, IgE-антитело, IgM-антитело, IgG1-антитело, IgG2-антитело, IgG3-антитело, IgG4-антитело или IgG4-антитело, содержащее по меньшей мере одну мутацию в шарнирном участке, которая ослабляет тенденцию к образованию внутри-Н-цепочечной дисульфидной связи. В другом аспекте выделенный антигенсвязывающий белок включает константную область тяжелой цепи одного из указанных антител; в другом аспекте, константная область представляет собой полипептид, включающий SEQ ID NO: 72; полипептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью к SEQ ID NO: 72; полипептид с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO: 72, из которой были удалены одна, две, три, четыре или пять N-концевых и/или C-концевых аминокислот; или один из указанных выше полипептидов, который включает одну или несколько посттрансляционных модификаций. В одном варианте, выделенный антигенсвязывающий белок включает константную область легкой каппа-цепи, в другом варианте он включает участок легкой ламбда-цепи. В одном варианте, константный участок легкой цепи представляет собой полипептид, включающий SEQ ID NO: 70; полипептид, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью к SEQ ID NO: 70; полипептид с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO: 70, из которой были удалены одна, две, три, четыре или пять N-концевых и/или C-концевых аминокислот; или один из указанных выше полипептидов, который включает одну или несколько посттрансляционных модификаций.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к антигенсвязывающему белку, специфичному для гетеродимера альфа4бета7, содержащему тяжелую цепь и легкую цепь, каждая из которых включает одну или несколько областей, определяющих комплементарность, или CDR. В другом аспекте осуществления настоящего изобретения, вариabельная область тяжелой цепи включает CDR1, CDR2 и CDR3, и вариabельная область легкой цепи включает CDR1, CDR2 и CDR3.

В другом аспекте осуществления настоящего изобретения, вариabельная область тяжелой цепи также включает четыре рамочных участка (FR), обозначенных как FR1, FR2, FR3 и FR4, и вариabельная область легкой цепи также включает четыре рамочных участка (FR), обозначенных как FR1, FR2, FR3 и FR4. В одном аспекте FR выбирают из тех же SEQ ID NO, что и CDR; в другом аспекте FR выбирают из других SEQ ID NO.

В другом варианте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, специфичному для гетеродимера альфа4бета7, содержащему вариabельную область тяжелой цепи, которая включает CDR1, CDR2 и CDR3, и вариabельную область легкой цепи, которая включает CDR1, CDR2 и CDR3, где каждый соответствующий CDR по меньшей мере на 90% идентичен CDR, выбранной из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из SEQ ID NO: 9, и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 37. В другом аспекте CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепей идентичны соответствующим CDR указанных SEQ ID NO. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, вариabельная область тяжелой цепи также включает четыре рамочных участка (FR), обозначенных как FR1, FR2, FR3 и FR4, и вариabельная область легкой цепи также включает четыре рамочных участка (FR), обозначенных как FR1, FR2, FR3 и FR4. В одном аспекте, FR выбирают из тех же SEQ ID NO, что и CDR; в другом аспекте, FR выбирают из других SEQ ID NO.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному антигенсвязывающему белку, специфичному для гетеродимера альфа4бета7, характеризующемуся показателем EC₅₀ менее 35 нг/мл в тесте на связывание CD4⁺ Т-клеток памяти; другой аспект относится к выделенному антигенсвязывающему белку, специфичному для гетеродимера альфа4бета7, характеризующемуся показателем EC₅₀ менее чем 10 нг/мл, в тесте на связывание CD4⁺ Т-клеток памяти. В другом варианте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, специфичному для гетеродимера альфа4бета7, кото-

рый характеризуется показателем IC_{50} в конкурентном тесте с MAdCAM меньше чем 30 нг/мл; в другом варианте, настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, специфичному для гетеродимера альфа4бета7, который имеет показатель IC_{50} менее чем 10 нг/мл, в конкурентном тесте с MAdCAM. Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному антигенсвязывающему белку, специфичному для гетеродимера альфа4бета7, который связывается с S250N мутантом альфа4бета7.

Настоящее изобретение, в одном варианте своего осуществления, относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанные выше полипептиды. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, указанная нуклеиновая кислота представляет собой вектор. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, трансформированным или трансфицированным нуклеиновыми кислотами по настоящему изобретению. В другом аспекте настоящего изобретения относится к способу получения полипептида, включающему инкубирование клеток-хозяев в условиях, способствующих экспрессии полипептидов, и сбор полученных полипептидов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной клетке, которая секретирует антигенсвязывающий белок, который связывается с альфа4бета7. В другом варианте указанная клетка представляет собой гибридому. В другом варианте настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего белка, который специфически связывается с альфа4бета7 (т.е. с человеческим альфа4бета7), включающему инкубирование указанной выделенной клетки в условиях, которые позволяют экспрессировать указанный антигенсвязывающий белок.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с гетеродимером альфа4бета7. В другом варианте выделенный антигенсвязывающий белок, при его связывании с человеческим альфа4бета7, ингибирует связывание альфа4бета7 с MAdCAM-1. Соответственно, один вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу ингибирования по меньшей мере одной активности альфа4бета7, который включает контактирование клетки, экспрессирующей альфа4бета7, с антигенсвязывающим белком, специфичным для гетеродимера альфа4бета7, так что указанная активность частично или полностью ингибируется. В одном аспекте, такой способ выполняется *in vivo*. В одном аспекте осуществления настоящего изобретения, указанный выделенный антигенсвязывающий белок, ингибирует адгезию клеток, экспрессирующих альфа4бета7, с клетками, экспрессирующими MAdCAM-1. В еще одном аспекте осуществления настоящего изобретения, указанный выделенный антигенсвязывающий белок ингибирует транспорт клеток, экспрессирующих альфа4бета7, в области тканей, занятых клетками, экспрессирующими MAdCAM-1; в одном примере осуществления такого варианта, выделенный антигенсвязывающий белок ингибирует транспорт лимфоцитов в кишку.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей антигенсвязывающий белок. В одном варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения состояния у субъекта, включающему введение фармацевтической композиции указанному субъекту, где указанное состояние подлежит лечению посредством снижения активности (частично или полностью) альфа4бета7 у субъекта. В другом варианте указанный субъект представляет собой человека. В другом варианте указанное состояние представляет собой воспалительное состояние желудочно-кишечного тракта. Таким образом, предлагается способ лечения индивидуума, имеющего состояние, которое характеризуется несоответствующим транспортом клеток, экспрессирующими альфа4бета7, в ткани, включающие клетки, которые экспрессируют MAdCAM, где указанный способ включает введение индивидууму антигенсвязывающего белка, специфичного для гетеродимера альфа4бета7, в количестве, достаточном для ингибирования (частичного или полностью) транспорта клеток, экспрессирующих альфа4бета7, в ткани, включающие клетки, экспрессирующие MAdCAM. В одном варианте, указанное состояние представляет собой воспалительную болезнь кишечника, например, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь глютеновой недостаточности (нетропическая спру), энтеропатию, ассоциированную с серонегативными артропатиями, микроскопический или коллагеновый колит, эозинофильный гастроэнтерит или синдром воспаления резервуара, возникший после проктокоlectомии, и илеоанальный анастомоз. В другом варианте указанное состояние представляет собой панкреатит, инсулин-зависимый сахарный диабет, мастит, холецистит, холангит, перихолангит, хронический бронхит, хронический синусит, астму или болезнь "трансплантат против хозяина".

В другом варианте настоящее изобретение также относится к способу, который включает проведение указанному субъекту второго курса лечения. В другом варианте второй курс лечения проводится субъекту до и/или одновременно с введением и/или после введения указанной фармацевтической композиции указанному субъекту. В другом варианте указанный второй курс лечения включает введение противовоспалительного средства. В другом варианте вторая фармацевтическая композиция включает средство, выбранное из группы, состоящей из нестероидных противовоспалительных средств, стероидов и иммуномодулирующих средств. В другом варианте указанный способ включает проведение субъекту третьего курса лечения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения жизнеспособности у субъекта, включающему введение указанному субъекту фармацевтической композиции. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения активности альфа4бета7 у субъекта, при нали-

чии такой необходимости, включающему введение указанному субъекту фармацевтической композиции. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения альфа4бета7-опосредованного транспорта (например, альфа4бета7-опосредованный-хoming в кишке) у субъекта, при наличии такой необходимости, включающему введение указанному субъекту фармацевтической композиции.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, наборам и способам, относящимся к молекулам, которые связываются с интегрином альфа4бета7 ("альфа4бета7"), включающим молекулы, которые являются агонистами или антагонистами альфа4бета7, такие как анти-анти-альфа4бета7 антитела, фрагменты антител и производные антител, например, антагонистические анти-альфа4бета7 антитела, фрагменты антител или производные антител. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам и их производным и фрагментам, включающим нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, полностью или его часть, где указанный полипептид связывается с альфа4бета7, например, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей анти-альфа4бета7 антитело, полностью или его часть, фрагмент антитела или производное антитела, а также к плазмидам и векторам, включающим такие нуклеиновые кислоты, и к клеткам или клеточным линиям, включающим такие нуклеиновые кислоты и/или векторы и плазмиды. Настоящее изобретение также относится к способам, включающим, например, способы получения, идентификации или выделения молекул, которые связываются с альфа4бета7, таких как анти-альфа4бета7 антитела, к способам определения, связывается ли молекула с альфа4бета7, к способам определения, является ли рассматриваемая молекула агонистом или антагонистом для альфа4бета7, к способам создания композиций, таких как фармацевтические композиции, включающие молекулу, которая связывается с альфа4бета7, и к способам введения молекулы, которая связывается с альфа4бета7, субъекту, например, к способам лечения состояний, опосредованных альфа4бета7, и достижения агонистического или антагонистического воздействия на биологическую активность альфа4бета7 *in vivo* или *in vitro*.

Полинуклеотидные и полипептидные последовательности приведены в настоящем описании с использованием стандартных однобуквенных или трехбуквенных сокращенных обозначений. Если не указано иное, каждая полипептидная последовательность имеет amino-конец с левой стороны и карбокси-конец с правой стороны; каждая одноцепочечная последовательность нуклеиновой кислоты и верхняя цепь каждой двухцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты имеет 5'-конец слева и 3'-конец справа. Конкретная полипептидная или полинуклеотидная последовательность может быть также описана путем объяснения, как она отличается от стандартной последовательности.

Если не указано иное, научные и технические термины, использованные в тексте настоящего описания, имеют общепринятые значения, известные специалистам в данной области. Кроме того, если из контекста не следует иное, приведенные в единственном числе термины включают также их множественное число, а приведенные во множественном числе термины будут также включать единственное число. В основном, используемая в описании номенклатура, а также приведенные в данном тексте методы, относящиеся к культивированию клеток и тканей, к области молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, а также белковой химии и химии нуклеиновых кислот, включая процедуры гибридизации, известны специалистам в данной области и широко ими используются. Методы и процедуры по настоящему изобретению в основном осуществляются согласно стандартным способам, известным в данной области и описанным в различных руководствах и конкретных статьях, которые приведены и обсуждаются в рамках настоящего описания, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), где указанные руководства включены в настоящее описание в качестве ссылок. Ферментативные реакции и методы очистки проводятся по инструкциям производителей, как это принято в данной области, или в соответствии с приведенным в настоящем описании материалом. Терминология, использованная в настоящем описании, а также приведенные в данном тексте способы осуществления лабораторных процедур и методов аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии хорошо известны специалистам в данной области и широко ими используются. Для целей проведения химического синтеза, химических анализов, разработки фармацевтических препаратов, их изготовления, доставки и для лечения пациентов могут использоваться стандартные методики.

Если не указано иное, приведенные ниже термины должны иметь следующие значения.

Термин "выделенная молекула" (где указанная молекула представляет собой, например, полипептид, полинуклеотид или антитело) относится к молекуле, которая, согласно ее происхождению или источнику ее получения, (1) не ассоциирована с множеством природных компонентов, которые встречаются вместе с нею в ее нативном состоянии, (2) по существу не содержит других молекул из того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не существует в природе без воздействия человека. Таким образом, молекула, которая была химически синтезирована или синтезирована в клеточной системе, отличной от клетки, из которой она была получена, где она существовала в природном состоянии,

будет считаться "выделенной" из ассоциированных с нею в природном окружении компонентов. Молекула может быть также получена в виде, по существу свободном от ассоциированных с нею в природном окружении компонентов, путем выделения, с использованием методов очистки, известных в данной области. Чистота или гомогенность молекулы может быть оценена с использованием множества способов, известных в данной области. Например, чистота полипептидного образца может быть оценена путем электрофореза полиакриламидном геле и затем окрашивания геля для визуализации полипептида, с помощью методик, известных в данной области. Для достижения конкретных целей может проводиться разделение с более высокой разрешающей способностью в рамках процедур ВЭЖХ или других способов очистки, известных специалистам в данной области.

Термины "ингибитор альфа4бета7" и "антагонист альфа4бета7" используются взаимозаменяемо. Каждый из них обозначает молекулу, которая в явной мере ингибирует по меньшей мере одну функцию альфа4бета7. И наоборот, термин "агонист альфа4бета7" обозначает молекулу, которая явно усиливает по меньшей мере одну функцию альфа4бета7. Ингибирование, вызванное ингибитором альфа4бета7, необязательно должно быть полным, главное, чтобы оно выявлялось, например, в рамках некоторого используемого для этого теста. Может быть использован любой тест на функцию альфа4бета7, примеры таких тестов приведены в настоящем описании. Примерами функций альфа4бета7, которые могут ингибироваться ингибитором альфа4бета7 (или усиливаться под действием агониста альфа4бета7), включают связывание с лигандом (т.е. связывание с MAdCAM-1), адгезию с клетками, экспрессирующими лиганд, транспорт в конкретный компартмент, такой как кишка, высвобождение цитокинов, хемокинов и других медиаторов, повышение или усиление воспалительного ответа и повреждение ткани и т.п. Соответствующие примеры типов ингибиторов альфа4бета7 и агонистов альфа4бета7 включают, без ограничения, альфа4бета7-связывающие полипептиды, такие как антигенсвязывающие белки (например, белки, связывающие антиген альфа4бета7), антитела, фрагменты антител и производные антител.

Термины "пептид", "полипептид" и "белок", каждый, относятся к молекуле, включающей два или более аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями. Указанные термины охватывают, например, нативные и искусственные белки, белковые фрагменты, полипептидные аналоги (такие как мутеины, варианты и белки слияния), белковые последовательности, а также посттрансляционные или иным образом, ковалентно или нековалентно, модифицированные белки. Пептид, полипептид или белок могут быть мономерными или полимерными.

Термин "полипептидный фрагмент" в контексте настоящего описания относится к полипептиду, который имеет amino-концевую и/или карбокси-концевую делецию, в сравнении с соответствующим полноразмерным белком. Фрагменты могут составлять, например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот в длину. Фрагменты могут также достигать, например, максимум 1000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 или 10 аминокислот в длину. Указанные фрагменты могут быть также получены в результате протеолитического (или другого) процессинга, который, например, приводит к вариациям в amino- и /или карбокси-концевых частях, включающих от одной до пяти предполагаемых аминокислот. Фрагмент также может включать на одном или на обоих своих концах одну или несколько дополнительных аминокислот, например, аминокислотную последовательность из другого природного белка (например, Fc или лейциновый zipper-домен) или искусственную аминокислотную последовательность (например, искусственную линкерную последовательность или белковую метку).

Полипептиды по настоящему изобретению включают полипептиды, которые были модифицированы любым способом и на любом основании, такие, например, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) меняют связывающую аффинность при формировании белковых комплексов, (4) меняют связывающие аффинности; и (5) придают другие физико-химические или функциональные свойства или модифицируют их. Аналоги включают мутеины полипептида. Например, в природной последовательности могут быть осуществлены единичные или множественные замещения аминокислот (например, консервативные замещения аминокислот) (например, в части полипептида, за пределами одного или нескольких доменов, формирующих межмолекулярные контакты). Могут быть также использованы консенсусные последовательности для выбора подходящих для замещения аминокислотных остатков; специалисты понимают, что дополнительные аминокислотные остатки также могут быть замещены.

"Консервативное замещение аминокислот" представляет собой такое замещение, которое по существу не меняет структурные характеристики исходной последовательности (в частности, проводимое аминокислотное замещение не должно нарушать имеющуюся в исходной последовательности спиральную структуру или нарушать другие типы вторичной структуры, которые характеризуют исходную последовательность или являются важными для ее функциональной активности). Примеры известных в данной области вторичных и третичных структур полипептидов описаны в соответствующих руководствах: Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et al. Nature 354:105 (1991), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Настоящее изобретение также относится к непептидным аналогам полипептидов, связывающихся с альфа4бета7. Непептидные аналоги в основном используются в фармацевтической промышленности как лекарственные средства со свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Указанные типы непептидного соединения обозначаются как "пептидные миметики" или "пептидомиметики"; см., например, Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987), где указанные работы включены в настоящее описание в качестве ссылок. Пептидные миметики, которые структурно близки к терапевтическим пептидам, могут использоваться для достижения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. В основном, пептидомиметики структурно близки к исходному полипептиду (т.е. к полипептиду, который имеет желательное биохимическое свойство или желательную фармакологическую активность), такому как человеческое антитело, но где одна или несколько пептидных связей необязательно замещается связью, выбранной из группы, состоящей из --CH₂NH-, --CH₂S-, --CH₂--CH₂-, -CH=CH- (цис и транс-формы), --COCH₂-, -CH(OH)CH₂-- и --CH₂SO--, и указанное замещение осуществляется согласно методам, известным в данной области. Может также практиковаться системное замещение одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательностью с D-аминокислотой того же типа (например, D-лизином вместо L-лизина) с целью создания более стабильных пептидов. Кроме того, пептиды с напряженной структурой, включающие консенсусную последовательность или по существу идентичную консенсусную последовательность с некоторыми вариациями, могут быть получены по методам, известным в данной области (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992), где указанная работа включена в настоящее описание в качестве ссылок), например, путем использования внутренних цистеиновых остатков, способных к формированию внутримолекулярных дисульфидных мостиков, которые приводят к циклизации пептида.

"Вариант" полипептида (например, антитела) включает аминокислотную последовательность, где один или несколько аминокислотных остатков встроены, делетированы или замещены в аминокислотной последовательности в сравнении с другой полипептидной последовательностью. Варианты по настоящему изобретению включают белки слияния.

"Производное" полипептида представляет собой полипептид (например, антитело), который был химически модифицирован, например, посредством конъюгирования с другим химическим фрагментом (таким как, например, полиэтиленгликоль или альбумин, например, человеческий сывороточный альбумин), путем фосфорилирования и/или гликозилирования. Если не указано иное, термин "антитело" включает, в дополнение к антителам, включающим две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, их производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых приведены ниже.

"Антигенсвязывающий белок" представляет собой белок, включающий часть, которая связывается с антигеном, и необязательно в сочетании с его каркасной или рамочной частью, которая позволяет антигенсвязывающей части принимать конформацию, способствующую связыванию антигенсвязывающего белка с антигеном. Примеры антигенсвязывающих белков включает антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающую часть антитела), производные антитела и аналоги антитела. Антигенсвязывающий белок может включать, например, альтернативный каркасный белок или искусственный каркасный белок с привитыми CDR или CDR производными. Такие каркасные формы включают, без ограничения, полученные из антитела каркасные структуры, включающие мутации, введенные, например, с целью стабилизации трехмерной структуры антигенсвязывающего белка, а также полностью синтетические каркасы, включающие, например, биосовместимые полимеры. См., например, Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. Кроме того, могут использоваться пептидные миметики антител ("PAM"), а также каркасные структуры, основанные на миметиках антител, где роль каркасной структуры выполняют фибронектиновые компоненты.

Антигенсвязывающий белок может иметь, например, структуру природного иммуноглобулина. В контексте настоящего описания, термин "иммуноглобулин" обозначает тетрамерную молекулу. В случае природного иммуноглобулина, каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну "легкую" цепь (примерно размером 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (примерно размером 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область размером от примерно 100 до примерно 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи определяет константную область, в основном ответственную за эффекторную функцию. Легкие цепи человеческой молекулы подразделяются на легкие каппа- или ламбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируются на мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon цепи и определяют изотип антитела, такой как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В составе легких и тяжелых цепей, вариабельная и константная области соединяются "J" участком размером примерно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь включает "D" участок размером примерно 10 или более аминокислот. См., в основном, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (где указанное руководство включено полностью для всех целей). Вариабельные области каждой из легких/тяжелых пар цепей формируют сайт связывания антитела, так что интактный иммуноглобулин имеет два связывающих сайта.

Вариабельные области природных иммуноглобулиновых цепей демонстрируют такую же основную структуру, которая свойственна относительно консервативным рамочным участкам (FR), соединенным тремя гипервариабельными участками, также называемыми участками, определяющими комплементарность CDR. В направлении от N-конца к С-концу легкие и тяжелые цепи включают домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому из доменов проводят в соответствии с определением Кабата (Kabat et al. in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991). Другие системы нумерации аминокислот в иммуноглобулиновых цепях включают системы IMGT® (Международная информационная система ImMunoGeneTics; Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 29:185-203; 2005) и AHO (Honegger and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 309(3): 657-670; 2001).

Антитела могут быть получены из ряда источников, таких как сыворотка или плазма, которые содержат иммуноглобулины, имеющие различную антигенную специфичность. При проведении аффинной очистки, такие антитела могут быть обогащены определенной антигенной специфичностью. При этом, каждый обогащенный препарат антител обычно содержит менее чем примерно 10% антитела со специфической связывающей активностью для конкретного антигена. Проведение на основе таких препаратов нескольких раундов аффинной очистки может привести к повышению доли антитела с конкретной связывающей активностью для данного антигена. Антитела, полученные таким образом, известны как "моносpezifические". Моносpezifические антительные препараты могут быть получены с наличием до примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 99,9% антитела, обладающего конкретной связывающей активностью для определенного антигена.

Термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину или его антигенсвязывающей части, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если особо не указано иное. Антигенсвязывающие белки могут быть получены по методам рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие части включают, *inter alia*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, домен-специфические антитела (dAb) и фрагменты участка, определяющего комплементарность (CDR), фрагменты вариабельной области, одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диатела, триатела, тетраатела и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для поддержания специфической антигенсвязывающей способности с полипептидом.

Fab-фрагмент представляет собой одновалентный фрагмент, содержащий V_L, V_H, C_L и C_H1 домены; F(ab')₂-фрагмент представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, которые соединены дисульфидной связью по шарнирной области; Fd-фрагмент, содержащий V_H и C_H1 домены; Fv-фрагмент, содержащий V_L и V_H домены одного плеча антитела; и dAb-фрагмент содержит V_H домен, V_L домен или антигенсвязывающий фрагмент V_H или V_L домена (патент США № 6846634, 6696245, публикации по заявкам на патенты США № 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989).

Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антитело, в котором V_L и V_H участки соединены через линкер (например, синтетическую последовательность аминокислотных остатков) с образованием непрерывной белковой цепи, где линкер должен быть достаточно длинным, с тем чтобы белковая цепь могла складываться сама с собой и образовывать одновалентный антигенсвязывающий сайт (см., например, Bird et al., 1988, *Science* 242:423-26 and Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83). Диатела и бивалентные антитела включают две полипептидные цепи, где каждая полипептидная цепь включает V_H и V_L домены, соединенные линкером, который должен быть достаточно коротким, с тем чтобы позволить спаривание каждого домена с комплементарным доменом на другой полипептидной цепи (см., например, Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, and Poljak et al., 1994, *Structure* 2:1121-23). Если две полипептидных цепи диатела идентичны, то диатело, получаемое в результате спаривания, будет содержать два идентичных антигенсвязывающих сайта. Полипептидные цепи с разными последовательностями могут использоваться для получения диатела с двумя разными антигенсвязывающими сайтами. Аналогично, триатела и тетраатела представляют собой антитела, включающие три или четыре полипептидных цепи, соответственно, и образующие три или четыре антигенсвязывающих сайта, соответственно, которые могут быть одинаковыми или разными.

Участки, определяющие комплементарность (CDR), и рамочные участки (FR) данного антитела могут быть идентифицированы с использованием системы, описанной Kabat et al. *supra*; Lefranc et al., *supra* и/или Honegger and Pluckthun, *supra*. Один или несколько CDR могут быть включены в молекулу, ковалентно или нековалентно, с образованием антигенсвязывающего белка. Антигенсвязывающий белок может включать один или несколько CDR в качестве части более крупной полипептидной цепи, может ковалентно соединять один или несколько CDR с другой полипептидной цепью или может включать один или несколько нековалентно присоединенных CDR. Указанные CDR позволяют антигенсвязывающему белку специфично связываться с конкретным интересующим антигеном.

Антигенсвязывающий белок может содержать один или несколько связывающих сайтов. Если имеется более одного связывающего сайта, то такие связывающие сайты могут быть идентичными друг другу или могут быть разными. Например, природный человеческий иммуноглобулин в типичном случае

содержит два идентичных связывающих сайта, тогда как "биспецифическое" или "бифункциональное" антитело имеет два разных связывающих сайта.

Термин "человеческое антитело" включает все антитела, которые содержат одну или несколько вариабельных и константных областей, полученных из последовательностей человеческого иммуноглобулина. В одном варианте, все вариабельные и константные домены получены из последовательностей человеческого иммуноглобулина (полностью человеческое антитело). Такие антитела могут быть получены различными способами, примеры которых будут описаны ниже, включая получение путем иммунизации мыши определенным антигеном мыши, в условиях генетической модификации, с экспрессией антител, полученных из генов, кодирующих тяжелую и/или легкую цепь.

Гуманизированное антитело имеет последовательность, которая отличается от последовательности антитела, полученного из вида, отличного от человека, по замещению, делеции и/или добавлению одной или нескольких аминокислот, так что гуманизированное антитело, когда его вводят человеку, менее вероятно будет индуцировать иммунный ответ и/или оно будет индуцировать менее выраженный иммунный ответ, в сравнении с антителом из вида, отличного от человека. В одном варианте, некоторые аминокислоты в рамочной области и в константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела из вида, отличного от человека, подвергают мутации с получением гуманизированного антитела. В другом, варианте, один или несколько константных доменов из человеческого антитела подвергают слиянию с одним или несколькими вариабельными доменами молекулы из вида, отличного от человека. В другом варианте один или несколько аминокислотных остатков в одной или нескольких CDR последовательностях антитела из вида, отличного от человека, изменяют для снижения возможной иммуногенности антитела из вида, отличного от человека, когда его вводят человеку, где указанные измененные аминокислотные остатки либо не являются важными для иммуноспецифического связывания антитела со своим антигеном, либо эти изменения в аминокислотной последовательности таковы, что они выполнены как консервативные изменения, так что связывание гуманизированного антитела с антигеном существенно не ухудшает связывание антитела из вида, отличного от человека, с антигеном. Примеры того, как могут быть получены гуманизированные антитела, описаны в патентах США № 6054297, 5886152 и 5877293.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, которое содержит один или несколько участков из одного антитела и один или несколько участков из одного или нескольких других антител. В одном варианте, один или несколько CDR получают из человеческого анти-альфа4бета7 антитела. В другом варианте все CDR получают из человеческого анти-альфа4бета7 антитела. В другом варианте CDR из более чем одного человеческого анти-альфа4бета7 антитела, смешивают и картируют в химерном антителе. Например, химерное антитело может содержать CDR1 из легкой цепи первого человеческого анти-альфа4бета7 антитела, CDR2 и CDR3 из легкой цепи второго человеческого анти-альфа4бета7 антитела и CDR из тяжелой цепи третьего анти-альфа4бета7 антитела. Другие сочетания возможны и также включаются в область настоящего изобретения.

Кроме того, рамочные участки могут быть получены из одних и тех же анти-альфа4бета7 антител, из одного или из нескольких других антител, таких как человеческого антитела, или из гуманизированного антитела. В одном примере, химерное антитело, часть тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны антителу из конкретного вида или из антитела, относящегося к конкретному классу антител или подклассу антител, или получены из такого антитела, тогда как оставшаяся одна или несколько цепей идентичны, гомологичны антителу или получены из одного или нескольких антител из другого вида или антитела, относящегося к другому классу или подклассу антител. В область настоящего изобретения также включаются фрагменты таких антител, которые демонстрируют желательную биологическую активность (т.е. способность специфически связываться с альфа4бета7). См., например, патент США № 4816567 и Morrison, 1985, Science 229:1202-07.

Термин "нейтрализующее антитело" или "ингибирующее антитело" обозначает антитело, которое ингибирует взаимодействие альфа4бета7 с MAdCAM-1, когда избыток анти-альфа4бета7 антитела снижает уровень взаимодействия по меньшей мере примерно на 20%, по данным теста, такого как приведенный в примерах настоящего описания. В разных вариантах, антигенсвязывающий белок снижает уровень взаимодействия альфа4бета7 с MAdCAM-1 по меньшей мере на 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 и 99,9%.

Фрагменты или аналоги антител могут быть получены любым специалистом в данной области в соответствии с описанием, приведенным в настоящем патенте, и по методам, известным в данной области. Аmino- и карбокси-концевые концы фрагментов или аналогов находятся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы при сравнении нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с соответствующими данными, приведенными в базах данных по таким последовательностям. Компьютерные методы сравнения могут использоваться для идентификации мотивов последовательности или для прогнозирования конформации доменов, которые имеются в других белках с известной структурой и/или функцией. Методы идентификации белковых последовательностей, которые складываются с образованием известной трехмерной структуры, известны в данной области. См., например, Bowie et al., 1991, Science 253:164.

"CDR-привитое антитело" представляет собой антитело, включающее один или несколько CDR,

полученных из антитела конкретного вида или изотипа и рамочной области другого антитела, того же или другого вида или изотипа.

"Полиспецифическое антитело" представляет собой антитело, которое распознает более чем один эпитоп в одном или нескольких антигенах. Подкласс этого типа антител представляет собой "биспецифическое антитело", которое распознает два разных эпитопа на одном и том же или на разных антигенах.

Считается, что антигенсвязывающий белок "специфически связывается" с антигеном (например, с человеческим альфа4бета7), если он связывается с антигеном и имеет константу диссоциации 1 наномоль или менее. В контексте настоящего описания, антигенсвязывающий белок является "специфическим для гетеродимера", если он связывается с первым гетеродимерным интегрином, но не связывается с другими интегринами, которые имеют одну цепь, совпадающую с первым интегрином. Например, антитело, которое является специфическим для гетеродимера альфа4бета7, будет связываться с альфа4бета7 и не связываться с альфа4бета1 или альфаЕбета7.

Известно, что интегрины образуют разные конформации, в зависимости от состояния активации одной или нескольких клеток, экспрессирующих их, и от наличия или отсутствия некоторых ионов металлов. Интегрин в "активной" конформации связывается со своим партнерским лигандом с большей активностью, чем тот же интегрин в "неактивной" конформации. Антигенсвязывающий белок может связываться с интегрином только в своей активной конформации, только в неактивной конформации или в обоих, или в какой-либо из этих конформации. Например, антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, может связываться с альфа4бета7 в присутствии или в отсутствие двухвалентного катиона марганца (Mn^{2+}), указывая на то, что антигенсвязывающий белок связывается и с активным, и с неактивным альфа4бета7.

"Антигенсвязывающий домен", "антиген-связывающая область" или "антигенсвязывающий сайт" представляют собой часть антигенсвязывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки (или другие фрагменты), которые взаимодействуют с антигеном и определяют специфичность и аффинность антигенсвязывающего белка для данного антигена. В случае антитела, которое специфически связывается со своим антигеном, он будет включать по меньшей мере часть по меньшей мере из одного своего CDR домена.

"Эпитоп" представляет собой часть молекулы, которая связывается с антигенсвязывающим белком (например, антителом). Эпитоп может включать не непрерывные части молекулы (например, в полипептиде, это аминокислотные остатки, которые не являются непрерывными в первичной последовательности полипептида, но которые в контексте третичной и четвертичной структуры полипептида практически могут связываться с антигенсвязывающим белком).

"Процент идентичности" двух полинуклеотидных или двух полипептидных последовательностей определяется в сравнении последовательностей с использованием компьютерной программы GAP (часть пакета прикладных программ GCG Wisconsin Package, версия 10.3 (Accelrys, San Diego, CA)) при введении заданных параметров.

Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используются взаимозаменяемо в ходе всего описания и включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием нуклеотидных аналогов (например, пептидных нуклеиновых кислот и неприродных нуклеотидных аналогов), а также их гибриды. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двуцепочечной. В одном варианте, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают непрерывную открытую рамку считывания, кодирующую антитело или его фрагмент, производное, мутеин или вариант по настоящему изобретению.

Двуцепочечные полинуклеотиды рассматриваются как "комплемент" друг для друга, если их последовательности могут быть выровнены в антипараллельной ориентации, так чтобы каждый нуклеотид в одном полинуклеотиде находится напротив своего комплементарного нуклеотида в другом полинуклеотиде без введения гэпов, и без нарушения нуклеотидов, имеющих на 5'-или 3'-концах любой последовательности. Полинуклеотид считается "комплементарным" другому полинуклеотиду, если два полинуклеотида могут гибридизоваться друг с другом в условиях умеренной жесткости. Таким образом, полинуклеотид может быть комплементарным другому полинуклеотиду и не быть его комплементом.

"Вектор" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая может использоваться для введения в клетку другой связанной с ней нуклеиновой кислоты. Одним типом вектора является "плазмида", которая представляет собой линейную или кольцевую двуцепочечную молекулу ДНК, внутри которой могут быть лигированы дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), где дополнительные сегменты ДНК могут быть введены в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, внутрь которой они были введены (например, бактериальные векторы, включающие бактериальные ориджины репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, соответственно, реплицируются вместе с геномом хозяина. "Вектор экспрессии" представляет собой такой тип вектора, который может на-

правлять экспрессию выбранного полинуклеотида.

Нуклеотидная последовательность считается "оперативно связанной" с регуляторной последовательностью, если регуляторная последовательность влияет на экспрессию (например, на уровень, время или локализацию экспрессии) нуклеотидной последовательности. "Регуляторная последовательность" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая влияет на экспрессию (например, на уровень, время или локализацию экспрессии) нуклеиновой кислоты, с которой она оперативно связана. Регуляторная последовательность может, например, проявлять свой эффект непосредственно на регулируемую нуклеиновую кислоту через воздействие на одну или несколько других молекул (например, полипептиды, которые связываются с регуляторной последовательностью и/или с нуклеиновой кислотой). Примеры регуляторных последовательностей включают: промоторы, энхансеры и другие контрольные элементы экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Другие примеры регуляторных последовательностей описаны, например, в работе Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA and Baron et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06.

"Клетка-хозяин" представляет собой клетку, которая может использоваться для экспрессии нуклеиновой кислоты, например, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может быть прокариотической, например, клеткой *E.coli*, или это может быть эукариотическая клетка, например, одноклеточного эукариота (например, дрожжей или других грибов), указанная клетка может также быть растительной клеткой (например, клеткой растений табака или томатов), клеткой животного (например, клеткой человека, клеткой обезьяны, клеткой хомяка, клеткой крысы, клеткой мыши или клеткой насекомых) или может представлять собой гибридому. Примеры клеток-хозяев включают клетки почки обезьяны (COS-7) (ATCC CRL 1651) (см. Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), L-клетки, C127-клетки, 3T3-клетки (ATCC CCL 163), клетки яичника хомяка (CHO) или их производные, такие как VEGGIE CHO и родственные клеточные линии, которые растут на бессывороточных средах (см. Rasmussen et al., 1998, *Cytotechnology* 28:31) или CHO, штамм DX-B11, дефектный по DHFR (см. Urlaub et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20), HeLa-клетки, клеточные линии BHK (ATCC CRL 10), клеточная линия CV1/EBNA, полученная из клеточной линии почки зеленой африканской обезьяны CV1 (ATCC CCL 70) (см. McMahon et al., 1991, *EMBO J.* 10:2821), клетки эмбриональной почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, человеческие эпидермальные клетки A431, человеческие клетки Colo205, трансформированные клеточные линии других приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из *in vitro* культуры первичной ткани, первичных эксплантов, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. В типичном случае, клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, которая может быть трансформирована или трансфицирована нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, который может быть затем экспрессирован в клетке-хозяине. Фраза "рекомбинантная клетка-хозяин" может использоваться для обозначения клетки-хозяина, которая была трансформирована или трансфицирована экспрессируемой нуклеиновой кислотой. Клетка-хозяин может также представлять собой клетку, которая включает нуклеиновую кислоту, но не экспрессирует ее на желательном уровне, если регуляторная последовательность не введена в клетку-хозяин, так что она становится оперативно связанной с нуклеиновой кислотой. Следует понимать, что термин "клетка-хозяин" относится не только к клетке конкретного субъекта, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут осуществляться в последующих поколениях в связи, например, с мутацией или воздействием окружающей среды, такое потомство фактически может быть не идентичным исходной клетке, тем не менее включается в область терминов, используемых в настоящем описании.

Антигенсвязывающие белки.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам (например, к антителам, фрагментам антител, производным антител, мутантам антител и вариантам антител), которые связываются с альфа4бета7, например, с человеческим альфа4бета7.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению включают антигенсвязывающие белки, которые ингибируют биологическую активность альфа4бета7. Примеры таких видов биологической активности включают связывание альфа4бета7 с MAdCAM-1 и адгезию между клетками, экспрессирующими альфа4бета7, и клетками, экспрессирующими MAdCAM-1. Другие виды биологической активности включают активность *in vivo*, опосредованную альфа4бета7, такую как транспортировка и хоуминг; в частности, альфа4бета7 вовлекается в транспортировку лимфоцитов в кишечник. Повышенная экспрессия MAdCAM-1 в воспаленной кишке усиливает рекрутмент лимфоцитов, экспрессирующих альфа4бета7, в кишку, где aberrантная активация лимфоцитов усиливает воспалительный ответ и повреждение ткани.

Различные антигенсвязывающие белки могут связываться с разными доменами или эпитопами альфа4бета7 или действовать в рамках других механизмов. Соответствующие примеры включают, без ограничения, антигенсвязывающие белки, которые препятствуют способности альфа4бета7 связываться с MAdCAM-1 или которые ингибируют клеточные взаимодействия, такие как адгезию между клетками, экспрессирующими альфа4бета7, и клетками, экспрессирующими MAdCAM-1. Сайт действия может быть, например, внутриклеточным (например, за счет создания препятствия для прохождения внутриклеточного сигнального каскада) или внеклеточным. Антигенсвязывающий белок необязательно полно-

стью ингибирует альфа4бета7-индуцированную активность для целей его использования согласно настоящему изобретению; поскольку антигенсвязывающие белки, которые снижают определенную активность альфа4бета7, также рассматриваются как пригодные в этом контексте. (Обсуждение конкретных механизмов действия антигенсвязывающих белков, связывающих альфа4бета7, при лечении определенных заболеваний, является лишь иллюстративным, и методы, представленные в настоящем описании не являются ограничивающими).

Другие производные анти-альфа4бета7 антител по настоящему изобретению включают ковалентные или агрегированные конъюгаты анти-альфа4бета7 антител или их фрагментов с другими белками или полипептидами, такими как образуемые при экспрессии рекомбинантные белки слияния, включающие гетерологичные полипептиды, слитые с N-концом или C-концом анти-альфа4бета7 антительного полипептида. Например, конъюгированный пептид может представлять собой гетерологичный сигнальный (или лидерный) полипептид, например, лидерный полипептид альфа-фактора дрожжей или пептид, такой как эпитопная метка. Белки слияния, содержащие антигенсвязывающий белок, могут включать пептиды, добавленные для облегчения очистки или идентификации антигенсвязывающего белка (например, поли-His). Антигенсвязывающий белок может быть также присоединен к FLAG® пептиду Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 62), как описано в Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988, и патенте США № 5011912. FLAG® пептид характеризуется высокой антигенностью и представляет собой эпитоп, обратимо связываемый специфическим моноклональным антителом (mAb), что позволяет провести быстрое тестирование и облегчает очистку экспрессированного рекомбинантного белка. Реагенты, используемые для получения белков слияния, которые применимы для объединения FLAG® пептида с данным полипептидом, коммерчески доступны (Sigma-Aldrich, St. Louis MO).

Олигомеры, которые содержат один или несколько антигенсвязывающих белков, могут использоваться в качестве антагонистов альфа4бета7. Олигомеры могут быть представлены в форме ковалентно связанных или нековалентно связанных димеров, тримеров или олигомеров более высокого порядка. Олигомеры, включающие два или более антигенсвязывающих белков, рассматриваются в контексте настоящего описания как пригодные для использования, где один из примеров включает гомодимер. Другие олигомеры включают гетеродимеры, гомотримеры, гетеротримеры, гомотетрамеры, гетеротетрамеры и т.п.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к олигомерам, включающим множество антигенсвязывающих белков, соединенных посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия между пептидными фрагментами, объединяемыми с антигенсвязывающими белками. Такие пептиды могут представлять пептидные линкеры (спейсеры) или пептиды, которые способствуют олигомеризации. В числе пептидов, которые могут способствовать олигомеризации присоединенных к ним антигенсвязывающих белков, могут использоваться лейциновые zipper и некоторые полипептиды, полученные из антител, как это будет более подробно описано ниже.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, указанные олигомеры включают от двух до четырех антигенсвязывающих белков. Указанные антигенсвязывающие белки олигомера могут быть представлены в любой форме, такой как любая из форм, описанных выше, например, в виде вариантов и фрагментов. Предпочтительно, олигомеры включают антигенсвязывающие белки, которые обладают альфа4бета7-связывающей активностью.

В одном варианте, олигомер получают с использованием полипептидов, выделенных из иммуноглобулинов. Получение белков слияния, включающих некоторые гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая, Fc домен) описано в литературе, например, в работах Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Bym et al., 1990, Nature 344:677; и Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к димеру, включающему два белка слияния, образованных за счет слияния альфа4бета7-связывающего фрагмента анти-альфа4бета7 антитела с Fc участком антитела. Указанный димер может быть получен, например, за счет встраивания гена слияния, кодирующего белок слияния в соответствующий вектор экспрессии, экспрессирующий белок слияния в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным вектором экспрессии, что позволяет проводить экспрессию белка слияния с последующей сборкой молекулы антитела с высокой степенью сходства, при этом образуются межцепочечные дисульфидные связи между Fc фрагментами с образованием димера.

Термин "Fc полипептид" в контексте настоящего описания включает нативные и мутеиновые формы полипептидов, полученных из Fc участка антитела. Усеченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирную область, которая способствует димеризации, также входят в область настоящего изобретения. Белки слияния, включающие Fc фрагменты (и полученные из них олигомеры), характеризуются тем преимуществом, что они облегчают очистку методами аффинной хроматографии на колонках с белком А или белком G.

Один из подходящих Fc полипептидов, описанный в PCT заявке WO 93/10151 (которая включена в

настоящее описание в качестве ссылки), представляет собой одноцепочечный полипептид, охватывающий область от N-концевого шарнирного участка до нативного C-конца Fc участка человеческого антитела IgG1. Другой подходящий для использования Fc полипептид представляет собой Fc мутеин, описанный в патенте США № 5457035 и в работе

Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. Аминокислотная последовательность этого мутеина идентична аминокислотной последовательности нативного Fc участка, описанного в WO 93/10151, за исключением того, что аминокислота 19 изменена с Leu до Ala, аминокислота 20 изменена от Leu до Glu, и аминокислота 22 изменена от Gly до Ala. Указанный мутеин демонстрирует сниженную аффинность к Fc рецепторам.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения, вариабельный участок тяжелой и/или легкой цепей анти-альфа4бета7 антитела может замещать вариабельный участок тяжелой и/или легкой цепей антитела.

Альтернативно, олигомер представляет собой белок слияния, включающий множество антигенсвязывающих белков, содержащих или не содержащих пептидные линкеры (спейсерные пептиды). В число подходящих пептидных линкеров входят соответствующие пептидные линкеры, описанные в патентах США № 4751180 и 4935233.

Другой способ получения олигомерных антигенсвязывающих белков включает использование лейцинового zipper. Домены лейцинового zipper представляют собой пептиды, которые способствуют олигомеризации белков, в которых они содержатся. Лейциновые zipper первоначально были идентифицированы в некоторых ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759) и с этого момента были обнаружены во множестве различных белков. В число известных лейциновых zipper входят природные пептиды и их производные, которые димеризуются или тримеризуются. Примеры доменов лейциновых zipper, подходящих для получения растворимых олигомерных пептидов, описаны в РСТ заявке WO 94/10308, а также включают лейциновый zipper, полученный из сурфактанта легких D (SPD), описанный в работе Норре et al., 1994, FEBS Letters 344:191, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Использование модифицированного лейцинового zipper, позволяющего достичь стабильной тримеризации гетерологичного белка, слитого с ним, описана в работе Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. В рамках одной стратегии, рекомбинантные белки слияния, включающие фрагмент анти- альфа4бета7 антитела или его производное, слитые/ое с пептидом лейцинового zipper, экспрессируют в подходящих клетках-хозяевах и образуемые при этом растворимые олигомерные фрагменты или производные анти-альфа4бета7 антитела выделяют из культурального супернатанта.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые препятствуют связыванию альфа4бета7 с MAdCAM-1. Такие антигенсвязывающие белки могут быть получены против альфа4бета7 или его фрагмента, варианта или производного и скринированы в рамках стандартных тестов для оценки их способности препятствовать связыванию альфа4бета7 с MAdCAM-1. Примеры подходящих тестов включают тесты, которые определяют способность антигенсвязывающих белков ингибировать связывание MAdCAM-1 (т.е. растворимого MAdCAM-1) с клетками, экспрессирующими альфа4бета7, или которые определяют способность антигенсвязывающих белков снижать биологический или клеточный ответ, возникающий в результате взаимодействия MAdCAM-1 и альфа4бета7 (т.е. адгезию клеток, экспрессирующих альфа4бета7, с MAdCAM-1 или MAdCAM-1-экспрессирующими клетками). Дополнительные тесты, которые оценивают антигенсвязывающие белки, включают такие тесты, которые, в количественном или качественном варианте, сравнивают уровень связывания антигенсвязывающего белка с альфа4бета7 полипептидом, относительно уровня связывания известного антигенсвязывающего белка с альфа4бета7 полипептидом, несколько примеров которых описано ниже.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который демонстрирует видовую селективность. В одном варианте, указанный антигенсвязывающий белок связывается с одним или несколькими альфа4бета7 млекопитающего, например, с человеческим альфа4бета7, и одним или несколькими альфа4бета7 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, кошки, кролика, собаки, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда и примата, отличного от человека. В другом варианте антигенсвязывающий белок связывается с одним или несколькими альфа4бета7 приматов, например с человеческим альфа4бета7 и одним или несколькими из альфа4бета7 яванского макака, игрунки, макаки-резус, тамарина и шимпанзе обыкновенного. В другом варианте антигенсвязывающий белок связывается специфически с альфа4бета7 человека, яванского макаки, игрунки, макаки-резус, тамарина или шимпанзе. В другом варианте антигенсвязывающий белок не связывается с одним или несколькими альфа4бета7 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, кошки, кролика, собаки, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда и примата, отличного от человека. В другом варианте антигенсвязывающий белок не связывается с альфа4бета7 обезьян Нового Света, такого вида, как игрунка.

В другом варианте антигенсвязывающий белок не демонстрирует специфического связывания с каким-либо природным белком, отличным от альфа4бета7. В другом варианте антигенсвязывающий белок не демонстрирует специфического связывания с любым природным белком, отличным от альфа4бета7 млекопитающих. В другом варианте антигенсвязывающий белок не демонстрирует специфического связывания с любым природным белком, отличным от альфа4бета7 приматов. В другом варианте антиген-

связывающий белок не демонстрирует специфического связывания с любым природным белком, отличным от человеческого альфа4бета7. В другом варианте антигенсвязывающий белок специфически связывается с альфа4бета7 по меньшей мере одного вида примата, отличного от человека, альфа4бета7 яванского макака и альфа4бета7 человека. В другом варианте антигенсвязывающий белок специфически связывается с альфа4бета7 примата, отличного от человека, например, яванского макака, и с человеческим альфа4бета7 с близкой аффинностью по связыванию. В другом варианте антигенсвязывающий белок блокирует активность альфа4бета7 примата, отличного от человека, такого как яванский макак, и человеческого альфа4бета7. В другом варианте указанный антигенсвязывающий белок имеет близкие показатели IC50 или EC50 применительно к альфа4бета7 из приматов, отличных от человека, например, яванского макака, и альфа4бета7 человека, по результатам описанного теста.

Каждый специалист в данной области может определить селективность антигенсвязывающего белка для альфа4бета7 с использованием известных методов и в соответствии с приведенными в данном описании процедурами. Например, можно определить селективность с использованием методов вестерн-блоттинга, процедур FACS, ELISA или RIA.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к связыванию антигенсвязывающего белка с альфа4бета7 (например, с анти-альфа4бета7 антителом), которое характеризуется одной или несколькими из указанных выше характеристик: связывание происходит и с человеческим альфа4бета7, и с альфа4бета7 из приматов, отличных от человека, происходит ингибирование связывания MAdCAM-1 с альфа4бета7, ингибирование адгезии клеток, экспрессирующих альфа4бета7, с MAdCAM-1, ингибирование адгезии клеток, экспрессирующих альфа4бета7, с клетками, экспрессирующими MAdCAM-1, ингибирование миграции клеток, экспрессирующих альфа4бета7, к тканям, включающим клетки, экспрессирующие MAdCAM-1, связывание как с активной, так и с неактивной формой альфа4бета7, и вызывает относительно небольшую отрицательную регуляцию альфа4бета7, экспрессируемого на клеточной поверхности.

Антигенсвязывающие фрагменты антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению могут быть получены с использованием традиционных методик. Примеры таких фрагментов включают, без ограничения, Fab- и F(ab')₂-фрагменты. Фрагменты и производные антител, получаемые методами генетической инженерии, рассматриваются в настоящем изобретении.

Дополнительные варианты включают химерные антитела, например, гуманизированные версии моноклональных антител из видов, отличных от человека (например, мышинные). Такие гуманизированные антитела могут быть получены в рамках известных методик, и они имеют преимущество, определяемое сниженной иммуногенностью при введении антител человеку. В одном варианте, гуманизированное моноклональное антитело включает вариабельный домен из мышинового антитела (или полностью, или часть его антигенсвязывающего сайта) и константный домен, полученный из человеческого антитела. Альтернативно, вариант гуманизированного антитела может включать антигенсвязывающий сайт мышинового моноклонального антитела и фрагмент вариабельного домена (не содержащий антигенсвязывающий сайт), полученный из человеческого антитела. Процедуры получения химерных моноклональных антител и других моноклональных антител в рамках геноинженерной стратегии включают, в частности, методы, описанные в приведенных ниже работах: Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323, Liu et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:3439, Larrick et al., 1989, *Bio/Technology* 7:934, и Winter et al., 1993, *TIPS* 14:139. В одном варианте, химерное антитело представляет собой антитело с присоединенным CDR. Процедуры гуманизации антител описаны в научной и патентной литературе, см., например, заявку на патент США № 10/194975 (опубликованную 27 февраля 2003 г.), патенты США № 5869619, 5225539, 5821337, 5859205, Padlan et al., 1995, *FASEB J.* 9:133-39 и Tamura et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1432-41.

Были описаны процедуры получения человеческих или частично человеческих антител с использованием животных, отличных от человека. Например, были получены мыши, у которых с помощью разных методов была достигнута инактивация одного или нескольких эндогенных генов иммуноглобулина. Далее, человеческие гены иммуноглобулинов встраивали в мышей для замещения инактивированных мышинных генов. При этом, образуемые у животных антитела включали полипептидные цепи человеческого иммуноглобулина, кодируемые генетическим материалом человека, который был введен в организм животного. В одном варианте, животное отличное от человека, такое как трансгенная мышь, иммунизировали полипептидом альфа4бета7, так что в организме животного создавались антитела против альфа4бета7 полипептида. Одним примером подходящего иммуногена является растворимый человеческий альфа4бета7, такой как полипептид, включающий часть альфа4бета7, или другой иммуногенный фрагмент альфа4бета7. Другой пример подходящего иммуногена включает клетки, экспрессирующие высокие уровни альфа4бета7, или полученные из них препараты клеточных мембран.

Примеры методик, подходящих для получения и использования трансгенных животных для продукции человеческих или частично человеческих антител, описаны в патентах США № 5814318, 5569825 и 5545806 и в работах Davis et al., 2003, *Production of human antibodies from transgenic mice* in Lo, ed. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Humana Press, NJ: 191-200, Kellermann et al., 2002, *Curr Opin Biotechnol.* 13:593-97, Russel et al., 2000, *Infect Immun.* 68:1820-26, Gallo et al., 2000, *Eur J Immun.* 30:534-40, Davis et al., 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18:421-25, Green, 1999, *J. Immunol Methods.* 231:11-23, Jakobovits,

1998, *Adv Drug Deliv Rev* 31:33-42, Green et al., 1998, *J Exp Med.* 188:483-95, Jakobovits A, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 7:607-14, Tsuda et al., 1997, *Genomics* 42:413-21, Mendez et al., 1997, *Nat Genet.* 15:146-56, Jakobovits, 1994, *Curr Biol.* 4:761-63, Arbones et al., 1994, *Immunity.* 1:247-60, Green et al., 1994, *Nat Genet.* 7:13-21, Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-58, Jakobovits et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:2551-55. Chen, J. et al., 1993, *Int Immunol* 5: 647-656, Choi et al., 1993, *Nature Genetics* 4: 117-23, Fishwild et al., 1996, *Nat Biotechnol* 14: 845-51, Harding et al., 1995, *Ann NY Acad Sci*, Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, Lonberg et al., 1995, *Int Rev Immunol* 13: 65-93, Neuberger, 1996, *Nat Biotechnol* 14: 826, Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research* 20: 6287-95, Taylor et al., 1994, *Int Immunol* 6: 579-91, Tomizuka et al., 1997, *Nat Gen* 16: 133-43, Tomizuka et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 722-27, Tuailon et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 3720-24, и Tuailon et al., 1994, *J Immunol* 152: 2912-20. Эти и другие примеры обсуждаются в публикации по заявке на патент США 2 0 07-0098715, опубликованной 3 мая 2007 г.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые связываются с альфа4бета7. Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любой методики, известной в данной области, например, путем иммортализации клеток селезенки, взятых от трансгенного животного после проведения процедуры иммунизации. Клетки селезенки могут быть иммортализованы с использованием известной методики, например путем слияния их с миеломными клетками с получением гибридом. Миеломные клетки, используемые в процедурах слияния, проводимых с целью получения гибридом, предпочтительно представляют собой не продуцирующие антитела клетки, обладают высокой эффективностью по слиянию, а также характеризуются ферментативной недостаточностью, что придает им неспособность расти на определенных селективных средах, которые поддерживают рост только определенных слитых клеток (гибридом). Примеры подходящих клеточных линий для проведения процедур слияния с использованием мышиных клеток включают: Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag4 1, Sp210-Agl4, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XX0 Bul; примеры клеточных линий, используемых в процедурах слияния с использованием клеток крыс включают: R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210. Другие клеточные линии, используемые для слияния клеток включают U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

В одном варианте, гибридную клеточную линию получают путем иммунизации животного (например, трансгенного животного, включающего последовательность человеческого иммуноглобулина) альфа4бета7 иммуногеном; отбор клеток селезенки из иммунизированного животного; слияние собранных клеток селезенки с миеломной клеточной линией, что приводит к получению гибридных клеток; установление гибридных клеточных линий из гибридных клеток и идентификация гибридной клеточной линии, которая продуцирует антитело, связывающееся с полипептидом альфа4бета7. Такие гибридные клеточные линии и получаемые с их использованием анти-альфа4бета7 моноклональные антитела входят в область настоящего изобретения.

Моноклональные антитела, секретируемые гибридной клеточной линией, могут быть очищены с использованием любой известной в данной области методики. Гибридомы или моноклональные антител могут быть далее скринированы для идентификации мАт, обладающих конкретными свойствами, такими как способность блокировать активность, индуцированную альфа4бета7. Примеры таких скринингов приведены в указанных ниже примерах.

Моноклональные антитела могут быть также получены с использованием процесса, известного как генетическая иммунизация. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая интересующий антиген, может быть включена в вирусный вектор (такой как аденовирусный вектор). Полученный вектор далее используют для выработки иммунного ответа против антигена, представляющего интерес, в организме подходящего животного-хозяина (например, у диабетических мышей без сопутствующего ожирения или NOD). Этот метод описан в основных чертах в работе Ritter et al., *Biodrugs* 16(1): 3-10 (2002), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Для выделения антител с повышенной аффинностью также учитывалась молекулярная эволюция участков, определяющих комплементарность (CDR), в центре сайта связывания антител, например, антител, обладающих повышенной аффинностью к с-erbB-2, как описано Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551. Соответственно, такие методики применимы для получения антител против альфа4бета7.

Антигенсвязывающие белки против альфа4бета7 могут использоваться, например, в тестах, проводимых с целью детекции альфа4бета7 полипептидов или клеток, экспрессирующих альфа4бета7, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Антигенсвязывающие белки могут также использоваться при очистке альфа4бета7 белков методами иммунологической аффинной хроматографии. Такие антигенсвязывающие белки, которые дополнительно способны блокировать взаимодействие MAdCAM-1 и альфа4бета7, могут использоваться для ингибирования биологической активности, возникающей в результате такого рода взаимодействия. Блокирование антигенсвязывающих белков может использоваться в методах по настоящему изобретению. Такие антигенсвязывающие белки, которые функционируют в качестве антагонистов альфа4бета7, могут использоваться при лечении любого индуцированного альфа4бета7 состояния, включающего, без ограничения, воспалительные состояния. В одном варианте, человеческое альфа4бета7 мо-

ноклональное антитело, получаемое по процедурам, которые включают иммунизацию трансгенных мышей, используется при лечении таких состояний.

Антигенсвязывающие белки могут использоваться в процедуре *in vitro* или могут вводиться *in vivo* для ингибирования биологической активности, индуцированной альфа4бета7. Таким образом, указанное лечение может проводиться применительно к расстройствам, вызываемым или обостряемым (непосредственно или опосредованно) альфа4бета7 и его взаимодействием с MAdCAM-1, примеры которых приведены в настоящем описании. В одном варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения, включающему введение *in vivo* млекопитающему, при наличии необходимости, альфа4бета7-блокирующего антигенсвязывающего белка в количестве, эффективном для снижения биологической активности, индуцированной альфа4бета7.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению включают частично человеческие и полностью человеческие моноклональные антитела, которые ингибируют биологическую активность альфа4бета7. Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к человеческому моноклональному антителу, которое, по меньшей мере частично, блокирует взаимодействие человеческого альфа4бета7 с MAdCAM-1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, указанные антитела получают путем иммунизации трансгенной мыши альфа4бета7 иммуногеном. В другом варианте указанный иммуноген представляет собой человеческий альфа4бета7 полипептид (например, клетку, трансформированную или трансфицированную для экспрессии альфа4бета7, или клетку, которая в природном состоянии экспрессирует альфа4бета7). Гибридомные клеточные линии, полученные из таких иммунизированных мышей, где гибридома секретирует моноклональное антитело, которое связывается с альфа4бета7, также могут использоваться в настоящем изобретении.

Несмотря на то, что человеческие, частично человеческие или гуманизированные антитела являются вполне подходящими для многих вариантов применения, в особенности тех, которые вовлекают введение антитела человеку, другие типы антигенсвязывающих белков также могут быть пригодны для некоторых вариантов применения. Антитела по настоящему изобретению, отличные от человеческих, могут представлять собой, например, антитела, полученный из антитело-продуцирующего животного, любого, такого как мышь, крыса, кролик, коза, осел или примат, отличный от человека (такого, как обезьяна (например, яванский макак или макак-резус), или обезьяна другого вида (например, шимпанзе)). Антитела, по настоящему изобретению, полученные из видов, отличных от человека, могут использоваться, например, *in vitro* и в формате клеточных культурах или в других методах применения, где иммунный ответ на антитело по настоящему изобретению не происходит, является незначительным, или может быть предупрежден, или не вызывает озабоченности, или имеет место любой другой желательный вариант. В одном варианте, антитело по настоящему изобретению полученное из вида, отличного от человека, вводят субъекту, отличному от человека. В другом варианте антитело из вида, отличного от человека, не вызывает иммунного ответа у субъекта, отличного от человека. В другом варианте антитело, отличное от человеческого, взятое из того же вида, что и субъект, отличный от человека, например, мышинное антитело по настоящему изобретению, вводят мыши. Антитело из животного определенного вида может быть получено, например, путем иммунизации животного указанного вида желательным иммуногеном (например, клетками, экспрессирующими альфа4бета7, или растворимым альфа4бета7 полипептидом) или с использованием искусственной системы образования антител указанного вида (например, в бактериальной системе или в системе на основе фагового дисплея для получения антител конкретного вида), или путем преобразования антитела из одного вида в антитело другого вида путем замещения, например, контактной области данного антитела константной областью, взятой из другого вида, или путем замещения одного или нескольких аминокислотных остатков антитела так, чтобы полученная последовательность больше соответствовала последовательности антитела из другого вида. В одном варианте, указанное антитело представляет собой химерное антитело, включающее аминокислотные последовательности, полученные из антител из двух или более разных видов.

Антигенсвязывающие белки могут быть получены с использованием любой из множества известных стандартных методик. Например, они могут быть выделены и очищены из клеток, которые в природном состоянии экспрессируют их (например, антитело может быть выделено и очищено из гибридомы, которая продуцирует его), или указанные антигенсвязывающие белки могут быть получены в системах рекомбинантной экспрессии с использованием любой известной в данной области методики. См., например, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Для получения рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению может использоваться любая система экспрессии, известная в данной области. В основном клетки-хозяева подвергают трансформации рекомбинантным вектором экспрессии, который включает ДНК, кодирующую желательный полипептид. В число клеток-хозяев, которые могут при этом использоваться, входят прокариоты, дрожжи или высшие эукариотические клетки. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E.coli* или бациллы. Высшие эукариотические клетки включают клетки насекомых и установленные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих клеточных линий

млекопитающих включают линии клетки почки обезьяны COS-7 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), клеточные линии на основе таких клеток, как, L-клетки, 293-клетки, C127-клетки, 3T3-клетки (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомяка (CHO), HeLa-клетки, ВНК (ATCC CRL 10) и клеточную линию CVI/EBNA, полученную из клеточной линии почки африканской зеленой мартышки CVI (ATCC CCL 70), как описано McMahon et al., 1991, EMBO J. 10: 2821. Подходящие векторы клонирования и экспрессии, используемые в сочетании с бактериальными, грибными, дрожжевыми клетками-хозяевами и клетками-хозяевами млекопитающих, описаны в работе Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985).

Трансформированные клетки могут культивироваться в условиях, которые способствуют экспрессии полипептида. Полипептид восстанавливают с использованием стандартных процедур очистки белка. Одна такая процедура очистки включает проведение аффинной хроматографии, например, с использованием матрицы, содержащей присоединенный к ней альфа4бета7, полностью или часть (например, внеклеточный домен). Полипептиды, которые могут использоваться в данном варианте осуществления настоящего изобретения, включают практически гомогенные рекомбинантные полипептиды альфа4бета7 антитела млекопитающих, по существу не содержащие контаминирующего эндогенного материала.

Аминокислотная последовательность полученных полипептидов может быть подтверждена с использованием известных в данной области процедур и может быть идентична последовательностям, описанным в списке последовательностей, прилагаемом к настоящему описанию, или может отличаться от этих последовательностей по одному или нескольким аминокислотным остаткам, в результате процессинга. Например, в указанных, по существу гомогенных полипептидах, полноразмерных или на их части, С-концевая аминокислота из легкой или тяжелой цепи (или соответствующей одноцепочечной молекулы) может быть удалена посредством протеолитического расщепления или другой обработки, проводимой в процессе культивирования, например, путем процессинга С-концевых Lys остатков. Альтернативно, удаляют более чем один С-концевой аминокислотный остаток, например, две С-концевых аминокислоты, или три, или четыре, или пять С-концевых аминокислот. В частности, было описано усечение С-конца до образования амидированного пролина в тяжелой цепи рассматриваемого антитела. Аналогично, N-концевые аминокислоты могут отсутствовать, например, могут отсутствовать одна, две, три, четыре или пять N-концевых аминокислот.

Альтернативно или дополнительно аминокислотный остаток могут подвергаться посттрансляционным модификациям, например, без ограничения, глутамин (в частности, глутамин на N-конце) может быть циклизован или превращен в пироглутаминовую кислоту; дополнительно или альтернативно, аминокислоты могут подвергаться дезамидированию, изомеризации, гликированию и/или окислению. Полипептиды по настоящему изобретению могут подвергаться дополнительным посттрансляционным модификациям, включая гликозилирование, например, N-связанное или O-связанное гликозилирование, по сайтам, известным в данной области. Как было описано ранее, указанные преобразования могут быть введены в аминокислотную последовательность полипептида для предупреждения или минимизации таких изменений, или для облегчения их в тех случаях, когда такой процессинг является благоприятным.

Препараты по существу гомогенных полипептидов могут включать примерно 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% полипептида, имеющего, в результате проведенного процессинга, определенную форму (или несколько форм). Препараты по существу гомогенных полипептидов могут включать несколько (менее или равно 50%), много (более чем 50%, но менее чем 90%) или по существу максимальное количество (более чем 90%) одной или нескольких конкретных форм процессированного полипептида. Кроме того, такие препараты могут включать полипептиды, которые характеризуются варьирующими уровнями наличия другого, более чем одного типа модификаций, связанных с процессингом, например, полипептид может характеризоваться наличием нескольких, преимущественно или по существу полностью, удаленных С-коцевых лизинов (например, С-концевого лизина в SEQ ID NO: 72) и преобразованием нескольких, преимущественно или по существу всех N-концевых аминокислот, в пироглутаминовую кислоту (например, любой полипептид, приведенный в табл. 1 и/или 2 или в списке консенсусных последовательностей).

Антигенсвязывающие белки могут быть получены и скринированы на наличие желательных свойств, по любой из множества известных методик. Некоторые такие методики включают выделение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидную цепь (или ее часть) в антигенсвязывающем белке, представляющем интерес (например, в анти-альфа4бета7 антителе) и манипулирование нуклеиновой кислотой в рамках технологии рекомбинантных ДНК. Нуклеиновая кислота может быть слита с другой представляющей интерес нуклеиновой кислотой или может быть изменена (например, путем мутагенеза или других традиционных процедур) с целью, например, добавления, делеции или замещения одного или нескольких аминокислотных остатков.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим фрагментам анти-альфа4бета7 антитела по настоящему изобретению. Такие фрагменты могут состоять полностью из последовательности, полученных из антитела, или могут включать дополнительные последовательности. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, диатела, триатела, тетратела и домены антител. Другие примеры описаны в работе Lunde et al., 2002, Biochem.

Soc. Trans. 30:500-06.

Одноцепочечные антитела могут быть получены при соединении фрагментов переменного домена тяжелой и легкой цепей (Fv участок) через аминокислотный мостик (короткий пептидный линкер) с образованием одноцепочечной полипептидной цепи. Такие одноцепочечные Fv (scFv) были получены при слиянии ДНК, кодирующей пептидный линкер, с использованием участков между ДНК, кодирующими два полипептида переменных доменов (V_L и V_H). Полученные полипептиды могут снова формировать складчатую структуру друг с другом с образованием антигенсвязывающих мономеров или при этом могут создаваться мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры), в зависимости от длины гибкого линкера между двумя переменными доменами (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). При объединении различных V_L - и V_H -содержащих полипептидов, можно создать мультимерные scFv, которые связываются с разными эпитопами (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Способы получения одноцепочечных антител включают такие методы, описанные в патенте США № 4946778; и в работах Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87.

Антигенсвязывающие белки (например, антитела, фрагменты антител и производные антител) по настоящему изобретению могут включать любую константную область, известную в данной области. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или ламбда-типа, например, константную область каппа- или ламбда-типа легкой цепи человека. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, константные области альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа тяжелой цепи молекулы человека. В одном варианте, константная область легкой или тяжелой цепи представляет собой фрагмент, производное, вариант или мутант природной константной области.

Известны методики получения антитела определенного подкласса или изотипа на основе антитела, представляющего интерес, т.е. способы переключения подкласса. Так, IgG антитела могут быть получены, например, из IgM антитела и наоборот. Такие методики позволяют получать новые антитела, которые обладают антигенсвязывающими свойствами для данного антитела (исходного антитела), но которые также демонстрируют биологические свойства, ассоциированные с антителом другого изотипа или подкласса, отличного от родительского антитела. Могут также использоваться технологии рекомбинантных ДНК. В таких процедурах может использоваться клонированная ДНК, кодирующая определенные полипептиды антител, например, ДНК, кодирующая константный домен антитела желательного изотипа. См. также Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16. Кроме того, если желательно получить IgG4, может быть удобно ввести точечную мутацию (CPSCP → CPPCP) в шарнирный участок (как описано в работе Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки), для снижения тенденции к образованию внутри-Н-цепочечных дисульфидных мостиков, которые могут вносить вклад в гетерогенность образуемых IgG4-антител.

Кроме того, известны также методики получения антигенсвязывающих белков с разными свойствами (т.е. с варьирующей аффинностью для антигена, с которым они связываются). Одна такая методика, известная как перестройка цепи, включает проявление генных репертуаров для переменного домена иммуноглобулина на поверхности нитевидного бактериофага, часто называемое как фаговый дисплей. Перестройка цепи использовалась для получения высокоаффинных антител для гаптен-2-фенилоксазол-5-она, как описано в работе Marks et al., 1992, BioTechnology, 10:779.

В другом варианте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который характеризуется низкой константой диссоциации из альфа4бета7. В одном варианте, указанный антигенсвязывающий белок имеет значение K_d , равное 100 пМ или менее. В другом варианте значение K_d составляет 10 пМ или менее; в другом варианте оно составляет 5 пМ или менее, или оно составляет 1 пМ или менее. В другом варианте значение K_d по существу такое же, как и у антитела, описанного в приведенных примерах. В другом варианте антигенсвязывающий белок связывается с альфа4бета7 по существу с тем же значением K_d , что и антитело, приведенное в примерах.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который ингибирует активность альфа4бета7, например, связывание (или адгезию) с MAdCAM-1, связывание с клетками, экспрессирующими MAdCAM-1, или адгезию между клетками, экспрессирующими альфа4бета7, и клетками, экспрессирующими MAdCAM-1. В одном варианте, антигенсвязывающий белок имеет значение IC_{50} , равное 100 пМ или менее. В другом варианте значение IC_{50} составляет 500 пМ или менее. В другом варианте значение IC_{50} составляет 100 пМ или менее; в другом варианте значение IC_{50} по существу такое же, как и у антитела, приведенного в примерах. В другом варианте антигенсвязывающий белок ингибирует активность альфа4бета7 по существу с тем же самым значением IC_{50} , что и антитело, описанное в приведенных в данном тексте примерах.

В одном варианте, антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению имеют кажущуюся аффинность для альфа4бета7 (или клеток, экспрессирующих альфа4бета7) на уровне 1000 пМ или ниже. В другом варианте антигенсвязывающие белки демонстрируют кажущуюся аффинность, равную 500 пМ или менее, 200 пМ или менее, 100 пМ или менее, 80 пМ или менее, 40 пМ или менее или 15 пМ или ме-

нее. В другом варианте антигенсвязывающий белок демонстрирует кажущуюся аффинность, которая по существу равна таковой для антитела, приведенного в примерах. В другом варианте антигенсвязывающий белок демонстрирует кажущуюся аффинность, которая по существу равна таковой для антитела, приведенного в примерах.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который связывается и с активной, и с неактивной формами альфа4бета7. В другом варианте антигенсвязывающий белок связывается только с одной формой или предпочтительно связывается только с одной формой альфа4бета7. Например, антигенсвязывающий белок может связываться с альфа4бета7 в присутствии или в отсутствие Mn^{2+} (т.е. он связывается и с активной, и с неактивной формами). Альтернативно, антигенсвязывающий белок может связываться с альфа4бета7 только в присутствии Mn^{2+} , или только в отсутствие Mn^{2+} , или он может связываться с более высокой аффинностью в одном из таких вариантов, чем в другом, указывая на предпочтительное связывание с конкретной формой альфа4бета7.

В другом варианте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который конкурирует за связывание альфа4бета7 с антителом по настоящему изобретению. Такая конкурентная способность может определяться по известным в данной области методам, например, при оценке конкурентного связывания с альфа4бета7-экспрессирующими клетками, по результатам FACS-анализа, сортировки активированных флуоресценцией клеток, или с использованием других аналогичных методов конкурентного анализа, таких как тест на адгезию (т.е. адгезию между клетками, экспрессирующими альфа4бета7, и клетками, экспрессирующими MAdCAM-1), или по результатам другого конкурентного теста, описанного в настоящем изобретении. В другом аспекте антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание альфа4бета7 с антителом по настоящему описанию, связывается с тем же самым эпитопом или происходит перекрывание эпитопов (или они расположены рядом), относительно эпитопов в данном антителе. В другом аспекте антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание альфа4бета7 с антителом по настоящему изобретению, ингибирует активность альфа4бета7.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который связывается с человеческим альфа4бета7, экспрессированным на поверхности клетки, и который при связывании ингибирует взаимодействие альфа4бета7 с MAdCAM-1, не снижая в значительной мере количества альфа4бета7 на поверхности клетки. Для этого может использоваться любой способ определения или оценки количества альфа4бета7 на поверхности и/или внутри клетки. В одном варианте, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который связывается с альфа4бета7, экспрессированным на поверхности клетки, и который при связывании ингибирует взаимодействие альфа4бета7 с MAdCAM-1, не вызывая значительного повышения уровня интернализации альфа4бета7 с поверхности клетки. В других вариантах, связывание антигенсвязывающего белка с клетками, экспрессирующими альфа4бета7, вызывает менее чем 75, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 1 или 0,1% интернализацию альфа4бета7 с клеточной поверхности.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, характеризующемуся периодом полувыведения, равным по меньшей мере один день *in vitro* или *in vivo* (например, при введении человеку). В одном варианте, антигенсвязывающий белок характеризуется периодом полувыведения, равным по меньшей мере три дня. В другом варианте антигенсвязывающий белок характеризуется периодом полувыведения, равным четыре дня или более. В другом варианте антигенсвязывающий белок характеризуется периодом полувыведения, равным восемь дней или более. В другом варианте антигенсвязывающий белок подвергают дериватизации или модификации, так что он имеет более длительный период полувыведения, в сравнении с недериватизированным или немодифицированным антигенсвязывающим белком. В другом варианте антигенсвязывающий белок содержит одну или несколько точечных мутаций для повышения периода полувыведения из сыворотки крови, как описано в WO 00/09560, опубликованном 24 февраля 2000 г., который включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Настоящее изобретение также относится к полиспецифичным антигенсвязывающим белкам, например, биспецифичному антигенсвязывающему белку, например, антигенсвязывающему белку, который связывается с двумя разными эпитопами альфа4бета7 или с эпитопом альфа4бета7 и эпитом другой молекулы, через два разных антигенсвязывающих сайта или участка. Кроме того, специфичный антигенсвязывающий белок по настоящему описанию может включать сайт связывания с альфа4бета7 из одного из описанных в данной работе антител и второй участок связывания с альфа4бета7 из других описанных антител, включая те, которые были описаны со ссылкой на другие публикации. Альтернативно, биспецифический антигенсвязывающий белок может включать антигенсвязывающий сайт из одного из описанных здесь антител, второй антигенсвязывающий сайт - из другого альфа4бета7 антитела, известного в данной области, или из антитела, которое было получено по известным методам или согласно приведенным в настоящем описании методам.

Различные способы получения биспецифичных антител известны в данной области и обсуждаются в заявке на патент США 09/839632, зарегистрированной 20 апреля 2001 г. (включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Такие методы включают использование гибридом, описанных Milstein et al., 1983, Nature 305:537, и других (в патенте США 4474893, в патенте США 6106833), а также химическое

связывание фрагментов антител (Brennan et al., 1985, Science 229:81; Glennie et al., 1987, J. Immunol. 139:2367; патент США 6010902). Кроме того, биспецифичные антитела могут быть получены в рамках рекомбинантной стратегии, например, при использовании фрагментов лейцинового zipper (т.е. из Fos и Jun белков, которые преимущественно формируют гетеродимеры; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547) или других lock и key интерактивных доменных структур, описанных в патенте США 5582996. Дополнительные, применяемые для достижения указанной цели подходы включают методы, описанные Kortt et al., 1997, *supra*; в патентах США № 5959083 и 5807706.

В другом аспекте антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению включает производное антитела. Дериватизированное антитело может включать любую молекулу или вещество, которая/ое придает желательные свойства рассматриваемому антителу, такие как повышенный период полувыведения в конкретном варианте использования. Дериватизированное антитело может включать, например, детектируемый (или используемый в качестве метки) фрагмент (например, радиоактивную, колориметрическую, антигенную или энзиматическую молекулу), детектируемый шарик (такой как магнитный или электронно-плотный (например, золотой) шарик), или молекулу, которая связывается с другой молекулой (например, биотин или стрептавидин), терапевтические или диагностические фрагменты (например, радиоактивный, цитотоксический или фармацевтически активный фрагмент), или молекулы, которые повышают пригодность антитела для конкретного варианта использования (например, для введения субъекту, такому как человек или другому субъекту в вариантах использования *in vivo* или *in vitro*). Примеры молекул, которые могут использоваться для дериватизации антитела, включают альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин) и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Связанные с альбумином и ПЭГилированные производные могут быть получены с использованием методики, известной в данной области. В одном варианте, указанное антитело конъюгируют или иным образом связывают с транстиретином (TTR) или с вариантом TTR. TTR или вариант TTR может быть химически модифицирован, например, химическим веществом, выбранным из группы, состоящей из декстрана, поли(н-винилпирролидона), полиэтиленгликолей, пропиленгликолевых гомополимеров, сополимеров полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированных полиолов и поливиниловых спиртов. См. заявку на патент США № 20030195154.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам скрининга молекулы, которая связывается с альфа4бета7, с использованием антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. В этой связи, может использоваться любая подходящая методика скрининга. В одном варианте, молекулу альфа4бета7 или ее фрагмент, с которым связывается антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению, приводят в контакт с антигенсвязывающим белком по настоящему изобретению и другой молекулой, где другая молекула связывается с альфа4бета7, если она снижает связывание антигенсвязывающего белка с альфа4бета7. Связывание антигенсвязывающего белка может выявлено с использованием любого подходящего метода, например ELISA. Детекция связывания антигенсвязывающего белка с альфа4бета7 может быть упрощена при введении детектируемой метки в антигенсвязывающий белок, как было описано выше. В другом варианте альфа4бета7-связывающую молекулу далее анализировали для определения, ингибирует ли она активацию и/или сигнальную функцию альфа4бета7.

Нуклеиновые кислоты.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты. Нуклеиновые кислоты включают, например, полинуклеотиды, которые кодируют полноразмерный антигенсвязывающий белок или его часть, например, одной или обеих цепей антитела по настоящему изобретению или их фрагмент, производное, мутеин или вариант, полинуклеотиды, достаточные для использования в качестве зондов для гибридизации, ПЦР-праймеров или праймеров для секвенирования с целью идентификации, анализа, мутирования или амплификации полинуклеотида, кодирующего полипептид, антисмысловые нуклеиновые кислоты для ингибирования экспрессии полинуклеотида и комплементарные последовательности указанных выше форм. Нуклеиновые кислоты могут иметь любую длину. Они могут включать, например, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1500, 3000, 5000 или более нуклеотидов в длину и/или могут включать одну или несколько дополнительных последовательностей, например, регуляторных последовательностей, и/или могут представлять собой часть более крупной нуклеиновой кислоты, например, вектора. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными и двуцепочечными и могут включать нуклеотиды РНК и/или ДНК и их искусственные варианты (например, пептидные нуклеиновые кислоты).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды антител (например, тяжелую или легкую цепь, только вариабельный домен или молекулу полноразмерной длины), могут быть выделены из В-клеток мышей, которые были иммунизированы альфа4бета7. Нуклеиновая кислота может быть выделена при использовании традиционных методик, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизируются с другими нуклеиновыми кислотами в конкретных условиях гибридизации. Способы гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны в данной области. См., например, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Как здесь описано, условия гибридизации в варианте умеренной жесткости включают использование раствора для предварительной промывки, содержащего

5X хлорид натрия/цитрат натрия (SSC), 0,5% ДСН, 1,0 мМ ЭДТА (pH 8,0), буфер для гибридизации, включающий примерно 50% формамида, 6X SSC, и температура гибридизации составляет 55°C (или используются другие подходящие растворы для гибридизации, такие как растворы, содержащие примерно 50% формамида, при температуре гибридизации 42°C), с использованием условий промывки, включающих температуру 60°C, в 0,5X SSC, 0,1% ДСН. Условия жесткой гибридизации включают проведение гибридизации в 6X SSC при температуре 45°C, с проведением впоследствии одной или нескольких промывок в 0,1X SSC, 0,2% ДСН при температуре 68°C. Кроме того, любой специалист в данной области может манипулировать условиями гибридизации и/или промывки для повышения или для снижения жесткости условий гибридизации, так чтобы нуклеиновые кислоты, включающие нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичны каждой другой последовательности, обычно, в типичном случае гибридизировались друг с другом. Основные параметры, влияющие на выбор условия гибридизации, и рекомендации по выбору подходящих условий, описаны, например, в руководствах Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; и *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4), и могут быть легко определены специалистами в данной области на основе, например, длины и/или состава оснований ДНК.

Изменения в нуклеиновую кислоту могут быть введены посредством мутации, что приводит к изменениям в аминокислотной последовательности полипептида (например, в антигенсвязывающем белке), который она кодирует. Мутации могут быть введены с использованием любой известно в данной области процедуры. В одном варианте, один или несколько конкретных аминокислотных остатков изменяют с использованием, например, протокола сайт-направленного мутагенеза. В другом варианте один или несколько случайно выбранных остатков изменяют с использованием, например, протокола случайного мутагенеза. И как только указанная процедура будет завершена, достигается экспрессия мутантного полипептида и проводится его скрининг на желательные свойства (например, на связывание с альфа4бета7 или на блокирование связывания альфа4бета7 с адрессином, таким как MAdCAM).

Мутации могут быть введены в нуклеиновую кислоту без существенного изменения биологической активности полипептида, который она кодирует. Например, могут быть осуществлены нуклеотидные замещения, которые приводят к замещениям в составе аминокислот по несущественным аминокислотным остаткам. В одном варианте, нуклеотидную последовательность или ее желательный фрагмент, вариант или производное мутируют таким образом, чтобы она кодировала аминокислотную последовательность, включающую одну или несколько делеций, или одно или несколько замещений аминокислотных остатков. В другом варианте мутагенез приводит к встраиванию аминокислот рядом с одним или несколькими аминокислотными остатками. Альтернативно, в нуклеиновую кислоту могут быть введены одна или несколько мутаций, что приводит к селективному изменению биологической активности (например, связывание с альфа4бета7, ингибирование связывания альфа4бета7 с адрессином, таким как MAdCAM, и т.п.) полипептида, который она кодирует. Например, мутация может, в количественном или качественном варианте, менять биологическую активность. Примеры количественных изменений включают повышение, снижение или устранение активности. Примеры качественных изменений включают изменение антигенной специфичности антигенсвязывающего белка.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые пригодны для использования в качестве праймеров или зондов для гибридизации с целью детекции последовательностей нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может включать только часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерный полипептид по настоящему изобретению, например, фрагмент, который может использоваться в качестве зонда или праймера, или фрагмент, кодирующий активную часть (например, альфа4бета7-связывающую часть) полипептида по настоящему изобретению.

Зонды, основанные на последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, могут использоваться для детекции нуклеиновой кислоты или родственных форм нуклеиновых кислот, например, транскриптов, кодирующих полипептид по настоящему изобретению. Указанные зонды могут включать меченую группу, например, радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Такие зонды могут использоваться для идентификации клетки, которая экспрессирует полипептид.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к векторам, включающим нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид по настоящему изобретению или его часть. Примеры векторов включают, без ограничения, плазмиды, вирусные векторы, неэнзимальные векторы млекопитающих и векторы экспрессии, например, рекомбинантные векторы экспрессии.

Рекомбинантные векторы экспрессии по настоящему изобретению могут включать нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Рекомбинантные векторы экспрессии включают одну или несколько регуляторных последовательностей, выбранных с учетом клеток-хозяев, используемых для экспрессии, которые оперативно связаны с экспрессируемой последовательностью нуклеиновой кислоты. Регуляторные последовательности

сти включают такие последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности в клетках-хозяевах многих типов (например, энхансер раннего гена SV40, промотор вируса саркомы Рауса и промотор цитомегаловируса), а также такие последовательности, которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности, см. Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236:1237, где указанные работы включены в настоящее описание полностью в качестве ссылки), и последовательности, которые направляют индуцибельную экспрессию нуклеотидной последовательности в ответ на определенное лечение или состояние (например, промотор металлотионеина в клетках млекопитающих и tet-отзывчивый и/или стрептомицин-отзывчивый промотор в системах прокариотов и эукариотов (см. id.). Для специалистов в данной области, очевидно, что разработка вектора экспрессии зависит от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии желательного белка и т.п. Векторы экспрессии по настоящему изобретению могут вводиться в клетки-хозяева для создания белков или пептидов, включая белки или пептиды слияния, кодируемые нуклеиновыми кислотами, приведенными в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, в которые был введен рекомбинантный вектор экспрессии по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариотическую клетку (например, *E.coli*) или эукариотическую клетку (например, клетки дрожжей, насекомых или млекопитающих (например, СНО-клетки)). Векторная ДНК может быть введена в прокариотические или эукариотические клетки с использованием стандартных методов трансформации или трансфекции. Применительно к стабильной трансфекции клеток млекопитающих, известно, что, в зависимости от используемого вектора экспрессии и используемого метода трансфекции, лишь небольшая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. Для идентификации и выбора таких интегрированных вариантов, в основном, в клетки-хозяева вместе с интересующим геном вводится ген, который кодирует селективируемый маркер (например, резистентность к антибиотику). Предпочтительные селективируемые маркеры включают такие маркеры, которые придают устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин и метотрексат. Клетки, стабильно трансфицированные введенной нуклеиновой кислотой, могут быть идентифицированы при проведении селекции на лекарственном средстве (например, клетки, которые включили селективируемый маркерный ген, будут выживать, тогда как другие клетки погибнут), в числе других используемых методов.

Показания.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта. Указанный способ может, например, оказывать в целом целительный эффект на субъекта, например, он может приводить к повышению ожидаемой продолжительности жизни у субъекта. Альтернативно, данный способ может представлять собой, например, лечение, профилактику, излечение, облегчение или ослабление ("лечение") заболевания, расстройства, состояния или болезни ("состояния"). Среди состояний, подлежащих лечению, по настоящему изобретению рассматриваются состояния, характеризующиеся несоответствующей экспрессией или активностью альфа4бета7. Такого рода состояния включают состояния, которые ассоциированы с несоответствующей миграцией клеток, например, миграцией лейкоцитов (каких как лимфоциты или моноциты) в желудочно-кишечный тракт или другие ткани, включающие клетки, которые экспрессируют MAdCAM-1 (в результате связывания лейкоцитов с клетками, которые экспрессируют MAdCAM-1). Заболевания, которые в этом случае могут лечиться, включают воспалительные болезни кишечника, такие как язвенный колит, болезнь Крона, болезнь глютеновой недостаточности (нетропическая спру), энтеропатию, ассоциированную с серонегативной артропатией, микроскопический и коллагенозный колит, эозинофильный гастроэнтерит или синдром воспаления резервуара, возникающий в результате проктоколоэктомии и илеоанального анастомоза. Дополнительные состояния, которые могут подвергаться лечению согласно настоящему изобретению, включают панкреатит, инсулинзависимый сахарный диабет, мастит, холецистит, холангит, перихолангит, хронический бронхит, хронический синусит, астму и болезнь "трансплантат против хозяина".

Способы лечения и введения антигенсвязывающих белков.

Некоторые способы, приведенные в настоящем описании, включают введение субъекту антигенсвязывающего белка, специфичного для гетеродимера альфа4бета7, что приводит к снижению альфа4бета7-индуцированного биологического ответа, играющего определенную роль в развитии конкретного состояния. В некоторых вариантах, способы по настоящему изобретению включают контактирование эндогенного альфа4бета7 с антигенсвязывающим белком, взаимодействующим с альфа4бета7, например, путем его введения субъекту или при осуществлении процедуры *ex vivo*.

Термин "лечение" обозначает ослабление или предупреждение по меньшей мере одного симптома или другого аспекта расстройства или снижение тяжести заболевания и т.п. Антигенсвязывающий белок необязательно должен оказывать полное излечение или устранение любого симптома или проявления заболевания, для того, чтобы он рассматривался как жизнеспособный терапевтический агент. Как известно в данной области, препараты, используемые в качестве терапевтических средств, могут снижать тяжесть состояния при данном заболевании, но необязательно должны устранять любое проявление заболевания, с тем чтобы их рассматривали как полезные терапевтические средства. Аналогично, прово-

димое в профилактическом режиме лечение необязательно полностью будет эффективно в плане профилактики возникновения состояния, с тем чтобы его можно было считать жизнеспособным профилактическим агентом. Просто ослабление проявления заболевания (например, за счет снижения количества симптомов или их тяжести его или путем повышения эффективности другого лечения, или путем создания другого благоприятного эффекта) или снижение вероятности того, что заболевание произойдет или что ухудшится состояние субъекта, будут достаточными основаниями. Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу, включающему введение пациенту антагониста альфа4бета7, в количестве и в течение периода времени, которые будут достаточными для индукции длительного улучшения состояния по выбранному индикатору, который характеризует тяжесть конкретного расстройства, относительно его базового уровня.

Согласно известному в данной области подходу, фармацевтические композиции, включающие молекулы по настоящему изобретению, могут вводиться субъекту в режиме, подходящем для данного показания. Фармацевтические композиции могут вводиться в подходящем режиме, включающем, без ограничения, парентеральное введение, местное введение или введение путем ингаляции. В случае инъекции, фармацевтические композиции могут вводиться, например, внутрисуставным, внутривенным, внутримышечным способом, внутрь поражения, внутривнутрино или подкожно, путем инъекции болюсом или путем непрерывной инфузии. Локализованное введение, например, в пораженный заболеванием сайт или в поврежденную зону, также рассматривается в настоящем изобретении, как и трансдермальная доставка, и длительное высвобождение из имплантата. Доставка путем ингаляции включает назальную или пероральную ингаляцию, использование небулайзера, ингаляцию антагонистом в аэрозольной форме и т.п. Другие альтернативы включают глазные капли, пероральные препараты, включающие пилюли, сиропы, леденцы или жевательные таблетки, и препараты для местного введения, такие как лосьоны, гели, спреи и мази.

В настоящем изобретении рассматриваются также процедуры применения антигенсвязывающих белков *ex vivo*. Например, кровь или другая жидкость из организма пациента может быть приведена в контакт *ex vivo* с антигенсвязывающим белком, который связывается с альфа4бета7. Антигенсвязывающий белок может быть связан с подходящей нерастворимой матрицей или твердым материалом подложки.

В одном из подходящих вариантов, антигенсвязывающие белки вводятся в форме композиции, которая включает один или несколько дополнительных компонентов, таких как физиологически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Необязательно, указанная композиция дополнительно включает одно или несколько физиологически активных средств, например, второе вещество, ингибирующее воспаление или иммунитет, анти-ангиогенное вещество, анальгетик и т.п., неограничивающие примеры которых приведены в настоящем описании. В разных конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, указанная композиция включает один, два, три, четыре, пять или шесть физиологически активных средств, в дополнение к альфа4бета7-связывающему антигенсвязывающему белку.

В одном варианте, указанная фармацевтическая композиция включает антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению в сочетании с одним или несколькими веществами, выбранными из группы, состоящей из буфера, антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота, низкомолекулярного полипептида (например, содержащие менее 10 аминокислот), белка, аминокислоты, углевода, такого как глюкоза, сахароза или декстрины, хелатирующего агента, такого как ЭДТА, глутатион, стабилизатора и эксципиента. Нейтральный солевой буфер или солевой раствор, смешанный с неспецифичным сывороточным альбумином, представляют собой примеры подходящих разбавителей. Согласно приемлемым стандартам производства, могут быть также добавлены консерванты, такие как бензиловый спирт. Композиция может быть изготовлена в виде лиофилизата с использованием растворов подходящих эксципиентов (например, сахарозы) в качестве разбавителя. Подходящие компоненты не токсичны для реципиентов в использованных дозировках и концентрациях. Другие примеры компонентов, которые могут использоваться при изготовлении фармацевтических композиций, описаны в руководстве Ремингтона (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. (1980) и 20th Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA).

В настоящем патенте описаны наборы для использования в медицинской практике, которые включают альфа4бета7-ингибирующее вещество по настоящему изобретению и этикетку или другие информативные материалы, содержащие инструкции по применению при лечении любого из состояний, приведенных в настоящем описании. В одном варианте, указанный набор включает стерильный препарат одного или нескольких альфа4бета7-связывающих антигенсвязывающих белков, которые могут быть в форме композиции, описанной выше, и могут быть введены в один или нескольких флаконов.

Дозировки и частота введения могут варьировать в зависимости от таких факторов, как способ введения, конкретно используемый антигенсвязывающий белок, природа и тяжесть заболевания, подлежащего лечению, каким является данное состояние, острым или хроническим, от размеров и общего состояния здоровья субъекта. Подходящие дозировки могут быть определены по процедуре, известной в данной области, например, используемой при проведении клинических испытаний, где указанные процедуры могут включать исследование с возрастающей дозой.

Альфа4бета7-ингибирующее вещество по настоящему изобретению может вводиться, например,

однократно или больше чем один раз, например, с регулярными интервалами в течение определенного периода времени. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, антигенсвязывающий белок вводят в течение периода времени, составляющего по меньшей мере один месяц или более, например, в течение одного, двух или трех месяцев, или даже неопределенно долго. Для лечения хронических состояний, наиболее эффективным в основном является длительное лечение. Однако для лечения острых состояний может быть достаточно введения в течение более коротких периодов времени, например, от одной до шести недель. В основном, антигенсвязывающий белок вводят до появления у пациента медицински значимой степени улучшения, по одному или нескольким выбранным индикаторам, относительно базового уровня.

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения включают введение антигенсвязывающего белка в дозе, составляющей от примерно 1 нг антигенсвязывающего белка на килограмм веса субъекта в день ("1 нг/кг/день") до примерно 10 мг/кг/день, более предпочтительно, от примерно 500 нг/кг/день до примерно 5 мг/кг/день, и наиболее предпочтительно, от примерно 5 мкг/кг/день до примерно 2 мг/кг/день субъекту. В дополнительных вариантах, антигенсвязывающий белок вводят взрослым пациентам один раз в неделю, два раза в неделю или три или более раз в неделю, при лечении опосредованного альфа4бета7заболевания, состояния или расстройства, например, медицинского расстройства по настоящему описанию. В случае инъекции, эффективное количество антигенсвязывающего белка в дозе для взрослого пациента может варьировать в диапазоне от 1 до 20 мг/м² и предпочтительно составляет примерно 5-12 мг/мл. Альтернативно, может вводиться равная доза, и количество может варьировать в диапазоне 5-100 мг/дозу. Один диапазон для равной дозы составляет примерно 20-30 мг на дозу. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, равная доза 25 мг/дозу повторно вводится путем инъекции. Если способ введения отличается от инъекции, то используемую дозу соответствующим образом корректируют, согласно стандартным медицинским подходам. Один из примеров подходящего терапевтического режима включает инъекцию дозы, включающей примерно 20-30 мг антигенсвязывающего белка, один-три раза в неделю в течение периода времени, составляющего по меньшей мере три недели, хотя может быть необходимо более длительное лечение для индукции желательной степени улучшения. В случае лечения детей (возраст 4-17 лет), один из репрезентативных подходящих режимов включает подкожную инъекцию дозы от 0,4 мг/кг до максимальной дозы, составляющей 25 мг антигенсвязывающего белка, вводимой два или три раза в неделю.

Конкретные варианты осуществления способов по настоящему изобретению включают подкожную инъекцию от 0,5 мг до 10 мг предпочтительно, от 3 до 5 мг антигенсвязывающего белка один или два раза в неделю. Другой вариант относится к легочному введению (например, с использованием небулайзера) 3 или более мг антигенсвязывающего белка один раз в неделю.

Примеры подходящих терапевтических режимов по настоящему описанию включают подкожную инъекцию антигенсвязывающего белка один раз в неделю в дозе 1,5-3 мг для лечения состояния, при котором важна роль альфа4бета7. Примеры таких состояний приведены в настоящем описании и включают, например, ревматические состояния, указанные выше, а также другие состояния, при которых играет существенную роль избыточное количество или несоответствующая миграция клеток, экспрессирующих альфа4бета7 (например, как было описано ранее, воспалительное заболевание кишечника, панкреатит и т.п.). Ежедневное введение антигенсвязывающего белка продолжают до достижения желательного результата, например, удаления симптомов у субъекта. Лечение может продолжаться, в зависимости от необходимости, или, альтернативно, могут применяться поддерживающие дозы.

Другие примеры терапевтических режимов по настоящему описанию включают подкожное или внутривенное введение дозы в 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 или 20 миллиграммов ингибитора альфа4бета7 по настоящему изобретению на килограмм массы тела субъекта (мг/кг). Указанная доза может вводиться субъекту однократно или более чем один раз с определенными интервалами, например, один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, три раза в месяц, два раза в месяц, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые шесть месяцев или один раз в год. Длительность лечения и изменение дозы/частоты лечения могут меняться или варьировать в ходе лечения, с тем чтобы соответствовать конкретным потребностям данного субъекта.

В другом варианте антигенсвязывающий белок вводят субъекту в количестве и в течение периода времени, которые являются достаточными для индукции улучшения, предпочтительно, для длительного улучшения, по меньшей мере по одному индикатору, который отражает тяжесть расстройства, подлежащего лечению. Могут оцениваться различные индикаторы, которые отражают выраженность болезни, заболевания или состояния у субъекта, для определения, являются ли выбранные количество и время лечения достаточными. Такие индикаторы включают, например, клинически значимые индикаторы тяжести заболевания, симптомов или проявлений того или иного рассматриваемого расстройства. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, указанное улучшение рассматривается как длительное, если у субъекта выявляются улучшение по меньшей мере в двух оцениваемых временных точках, взятых с интервалом от двух до четырех недель. Степень улучшения обычно определяется лечащим врачом, который может сделать вывод на основе признаков, симптомов, результатов оценки биопсийных образцов и данных других тестов, и, кроме того, лечащий врач может проводить анкетирование субъек-

та, например, с использованием разработанной для конкретного заболевания анкеты, включающей вопросы по оценке качества жизни.

Изменения в экспрессии альфа4бета7 и/или активации альфа4бета7 и/или в его связывании с партнером MAdCAM-1 ассоциированы с развитием большого числа расстройств, включающих, например, воспалительные состояния желудочно-кишечного тракта. Субъекты с данным расстройством могут быть скринированы для целей идентификации тех индивидуумов, у которых имеется измененная экспрессия и/или активация альфа4бета7 или MAdCAM-1, что позволяет выявить тех субъектов, которые могли бы получить благоприятный результат лечения с использованием альфа4бета7-связывающего антигенсвязывающего белка. Таким образом, способы лечения по настоящему изобретению необязательно включают первую стадию выявления у субъекта активации альфа4бета7 или MAdCAM-1 или оценки уровней экспрессии. Антигенсвязывающий белок может вводиться субъекту, у которого экспрессия и/или активация альфа4бета7 и/или MAdCAM-1 повышена сверх нормальных значений.

Уровни активности альфа4бета7 или MAdCAM-1 у субъекта могут отслеживаться до, во время и/или после лечения с использованием антигенсвязывающего белка, для выявления изменений, если они имеются, в активности альфа4бета7 или MAdCAM-1. В случае некоторых расстройств, наличие повышенной активности альфа4бета7 и/или MAdCAM-1 может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания или конкретная форма заболевания. Могут использоваться известные методики для определения такой активности, например, в образцах крови или в ткани субъекта. Активность альфа4бета7 или MAdCAM-1 может быть измерена с использованием любой подходящей методики.

Конкретные варианты осуществления способов и создания композиций по настоящему изобретению включают использование антигенсвязывающего белка и одного или нескольких дополнительных антагонистов альфа4бета7, например, двух или более антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, или антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению и одного или нескольких других антагонистов альфа4бета7. В других вариантах, антигенсвязывающий белок вводят один или в сочетании с другими средствами, используемыми для лечения состояния, имеющегося у данного пациента. Примеры таких средств включают лекарственные препараты как белковой, так и не белковой природы. Когда вводится множество терапевтических средств в курсе их совместного применения, дозировки могут быть откорректированы соответствующим образом, в соответствии с принятыми в данной области подходами. "Совместное введение" и комбинированная терапия не ограничены вариантом одновременного введения, на также включают такие режимы лечения, в которых антигенсвязывающий белок вводят по меньшей мере один раз в ходе всего курса лечения, который включает введение пациенту по меньшей мере одного другого терапевтического средства.

Примеры других средств, которые могут вводиться в объединенном режиме вместе с антигенсвязывающим белком, включают другие антигенсвязывающие белки или терапевтические полипептиды, которые выбирают с учетом конкретного состояния, подлежащего лечению. Альтернативно, не белковые лекарственные средства, которые используются для лечения одного из указанных выше конкретных состояний, могут вводиться в сочетании с антагонистом альфа4бета7.

Объединенная терапия.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта с использованием антигенсвязывающего белка, ингибирующего альфа4бета7, в сочетании с одной или несколькими другими видами терапии. В одном варианте, такая объединенная терапия приводит к достижению синергического, или дополнительного, эффекта, создаваемого, например, при воздействии на множественные сайты или молекулярные мишени в опухоли. Виды объединенной терапии, которые могут использоваться согласно настоящему изобретению, включают ингибирование или активацию (в зависимости от того, что приемлемо в конкретном случае) множества узлов на одном пути, относящемуся к конкретному заболеванию, множества путей в целевой клетке и множества клеточных типов в целевой ткани.

В другом варианте способ объединенной терапии включает введение субъекту двух, трех, четырех, пяти или более агонистов или антагонистов альфа4бета7 по настоящему описанию. В другом варианте указанный способ включает проведение субъекту двух или более вариантов лечения, которые в совместном режиме ингибируют или активируют (непосредственно или опосредованно) сигнальную трансдукцию, связанную с участием альфа4бета7. Примеры таких способов включают использование сочетания двух или более антигенсвязывающих белков, ингибирующих альфа4бета7, антигенсвязывающего белка, ингибирующего альфа4бета7, и одного или нескольких других терапевтических агентов, обладающих противовоспалительными свойствами (например, нестероидных противовоспалительных средств, стероидов и/или иммуномодуляторов), или антигенсвязывающего белка, ингибирующего альфа4бета7, в сочетании с одним или несколькими другими видами лечения (например, проведение хирургического лечения, ультразвукового лечения или эффективного противовоспалительного лечения). Применяемые для достижения этой цели средства, включающие, например, средства, которые используются для лечения, например, болезни Крона или язвенного колита, такие как аminosалицилаты (например, мезаламин), кортикостероиды (включающие предизон), антибиотики, такие как метронидазол или ципрофлоксацин (или другие антибиотики, используемые для лечения, например, пациентов со свищами), и иммуносупрессоры, такие как азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, такролимус и циклоспорин, могут быть

объединены с ингибиторами альфа4бета7. Сочетания таких средств также рассматриваются в настоящем изобретении в варианте их объединенного применения с ингибиторами альфа4бета7. Такие одно или несколько средств могут вводиться перорально или другим способом, например, при использовании суппозиторий или клизмы. Кроме того, одно или несколько анти-альфа4бета7 антител или производных антител могут использоваться в сочетании с одной или несколькими молекулами или в сочетании с другими видами лечения, где одна или несколько других молекул и/или видов лечения сами не приводят к непосредственному связыванию с альфа4бета7 или не воздействуют на альфа4бета7, но в сочетании будут эффективны для лечения или предупреждения того состояния, которое подлежит лечению. Например, ингибитор альфа4бета7 может использоваться в сочетании с лечением пробиотиками или с другой терапией, проводимой для восстановления или поддержания нормальной кишечной флоры. В одном варианте, одна или несколько молекул и/или видов терапии приводят к излечиванию или предупреждению состояния, которое вызывается одной или несколькими другими молекулами или видами лечения в курсе проводимой терапии, например, это может быть тошнота, усталость, алопеция, кахексия, бессонница и т.п. В каждом случае, когда используется сочетание молекул и/или нескольких видов лечения, отдельные одна или несколько молекул и/или видов лечения могут вводиться/проводиться в любом порядке, в течение любого периода времени, которое будет эффективно, например, это может проводиться в одновременном, последовательном или чередующемся режиме. В одном варианте, способ лечения включает проведение первого курса лечения с использованием одного вида молекул или завершение одного курса лечения перед началом второго курса лечения. Длительность периода времени между концом первого курса лечения и началом второго курса лечения может быть любой по времени, главное, чтобы достигалась эффективность проводимого общего курса терапии, например, это могут быть секунды, минуты, часы, дни, недели, месяцы или даже годы.

В другом варианте способ по настоящему изобретению включает введение одного или нескольких антагонистов альфа4бета7 по настоящему описанию и проведение одного или нескольких других видов лечения (например, терапевтического или паллиативного лечения). В том случае, когда рассматриваемый способ включает проведение субъекту более чем одного вида лечения, следует понимать, что порядок, время проведения, количество введений, концентрация и объем вводимых средств ограничены только медицинскими показателями и границами, определяемыми самим конкретным видом лечения, т.е. два вида лечения могут проводиться одному субъекту, например, в одновременном, последовательном, чередующемся режиме, или в соответствии с любым другим режимом.

Приведенные ниже примеры, как фактические, так и предполагаемые, даны с целью иллюстрации конкретных вариантов или особенностей настоящего изобретения и не ограничивают его область.

Пример 1. Получение антител.

Моноклональные антитела против человеческого альфа4бета7 были получены при иммунизации мышей XenoMouse™ XG2kappaalambda (kl) и XG4kl (трансгенные мыши, которые экспрессируют человеческий IgG2 или IgG4, и легкие каппа- и ламбда-цепи человеческой молекулы, соответственно; Abgenix Inc., Fremont CA) клетками, экспрессирующими человеческий альфа4бета7, представлявшие собой либо временно трансфицированные клетки эмбриональной почки человека (HEK) 293 (293-a4b7), либо стабильно трансфицированные клетки яичника китайского хомяка (CHO) (CHO-a4b7). Сывороточный титр отслеживали по результатам анализа методом (FACS), сортировки активированных флуоресценцией клеток, для сравнения клеток, трансфицированных альфа4бета7, с соответствующими исходными контрольными клетками. Гипериммунных животных, полученных по любому из протоколов иммунизации, умерщвляли, и ткани селезенки и лимфатических узлов подвергали процедуре гибридного слияния.

Антитела, специфичные для гетеродимера альфа4бета7, идентифицировали с использованием серии тестов. Гибридные супернатанты вначале скринировали по флуорометрической методике анализа в микрообъемах (FMAT™ Applera Corporation, Foster City CA; высокомасштабный скрининг для детекции клеточных систем) на связывание клеток, трансфицированных альфа4бета7, в сравнении с клетками в варианте ложной трансфекции. Супернатанты, идентифицированные как положительные по связыванию с альфа4бета7 (1001 положительных по связыванию супернатантов из варианта иммунизации CHO-a4b7-клетками и 1143 положительных по связыванию супернатантов из варианта иммунизации 293-a4b7-клетками) оценивали на их способность ингибировать адгезию HUT78-клеток с MAdCAM-1-Fc по методу, аналогичному описанному ранее (Erie, J. Immunol, (1994) 153:517). В рамках данного теста, 60 супернатантов из варианта применения CHO-a4b7 и 174 супернатанта из варианта применения 293-a4b7 продемонстрировали более чем 90% ингибирование (n=2), и их подвергли дальнейшему анализу для оценки специфичности и эффективности.

Были получены альфа4бета7-трансфицированные, альфа4бета1-трансфицированные и альфаЕбета7-трансфицированные клетки 293 и далее использованы в рамках FACS-анализа с гибридными супернатантами, идентифицированными в тесте на ингибирование. Супернатанты, которые демонстрировали связывание только с альфа4бета7-трансфицированными клетками, были классифицированы как специфичные для гетеродимеров, поскольку антитела против альфа4 субъединицы этого интегрин также будут связываться с альфа4бета1-трансфицированными клетками, и антитела, которые связываются с це-

пью бета7, будут также связываться с альфаЕбета7-трансфицированными клетками. Гибридомные супернатанты также проанализировали на связывающую активность с альфа4бета7-трансфицированными клетками 293 из яванского макака в рамках FACS-анализа. Семь линий из варианта применения для иммунизации СНО-а4б7 и 25 линий из варианта применения для иммунизации 293-а4б7 были выбраны для субклонирования и дальнейшего анализа.

Пример 2. Анализ антител.

Полученные антитело-секретирующие клетки были клонированы, и были выделены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, и секвенированы. Использовали сайт-направленный мутагенез для получения вариантов, отличающихся от выделенных последовательностей по одной или нескольким аминокислотным остаткам. Аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей антител и вариантов показаны в приведенных ниже табл. 1 и 2. Следует учитывать, что границы CDR и FR областей могут варьировать относительно показанных ниже, как это обсуждалось здесь ранее.

Таблица 1

Анализ последовательностей легких цепей

Легкая цепь	FR1	CDR1	FR2
1A10K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
11E7K1	EIVMTQSPATLSVSPGETATLSC	RASQTVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
11E7K2	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITC	RASQGIRNYLA	WYQRKPGKVPKLLIY
2F12K	DIQMTQSPSSVFASVGDRVITC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPNLLIY
14E4L	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
3A5K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQGVISWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
10D7K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQGVNNWLA	WYQQKPGKAPKLLIF
27D8K	EIVMMQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSTNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
18A11K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY
20D7K	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
23H6K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVNSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
27G8L	QSVLTQPPSVSEAPRQRTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26C7K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSDNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
26H3K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
19G6K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	QASQDINTYLN	WYQQKPGKVPKLLIY
22B2K	DVQMTQSPSSLSASVGDRVITC	QASQDITDYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
24A2K	EVMMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIF
26E9K	ELVMTQSPATLSVSPGERATVSC	RASQSVSSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
22F5K	EIVMTQSPATLSVFPGEATLSC	RASQSVSSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
26C10K	EIVLTQSPGTLSSLSPGEATLSC	RASQTVTSSYLA	WYQQSPSQSPRLLIY
17C8K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLV	WYQQKPGQAPRLLIY
25C9k	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQDISSWLA	WYQRKPGKAPKVLII
19E6L	SYELTQPPSVSVSPQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
26G2k	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQDISSWLA	WYQQKPGTAPKVLII
27G8L (a)	QSVLTQPPSVSGAPRQRTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
27G8L (b)	QSVLTQPPRSVSGAPRQRTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26H3K (c)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
1A10K (d)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY

Легкая цепь	CDR2	FR3
1A10K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
11E7K1	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
11E7K2	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYCC
2F12K	GASSLQN	GVPLRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
14E4L	DNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAILDITGLQTGEADYYC
3A5K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

10D7K	ATSSLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYC
27D8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYFC
18A11K	GASNLES	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFANYYC
20D7K	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
23H6K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
27G8L	HDDLPLS	GVSDRFSGSRGTSASLAISGLQSEDETDYYC
26C7K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26H3K	DASNLET	GVPSRFGSGSGTDFTFTINSLQPEDIATYFC
19G6K	DASNLET	GVPSRFGSGSGTDFTFTISGLQPEDIATYYC
22B2K	DTSNLEA	GVPSRFGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYC
24A2K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYCC
26E9K	GASSRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
22F5K	GASARAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26C10K	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
17C8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYC
25C9k	SASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
19E6L	QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
26G2k	SASSLQN	GVPSRFGSGSGTDFALTISSLQPEDFATYYC
27G8L (a)	HDDLPLS	GVSDRFSGSRGTSASLAISGLQSADETDYYC
27G8L (b)	HDDLPLS	GVSDRFSGSRGTSASLAISGLRSADETDYYC
26H3K (c)	DASNLET	GVPSRFGSGSGTDFTFTINSLQPEDIATYFC
1A10K (d)	AASILQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

Легкая цепь	CDR3	FR4
1A10K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
11E7K1	QQYDYWPPLT	FGGGTRVEIK
11E7K2	QKYDSAPFT	FGPGTKVDIK
2F12K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
14E4L	GTWDSLSAGRV	FGGGTKLTVL
3A5K	QQANSFPWT	FGQGTNVEIK
10D7K	QQVNSFPGT	FGQGTKVEIK
27D8K	QQYNDWPT	FGGGTKVEIK
18A11K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
20D7K	QQYDSSPPT	FGGGTKVAIK
23H6K	QQYDDWPPVT	FGQGTRLEIK
27G8L	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26C7K	QQYDDWPT	FGGGTRVEIK
26H3K	QQYDNLPCS	FGQGTKLEIK
19G6K	QQFDNLPIT	FGQGTRLEIK
22B2K	QQYDILPYS	FGQGTDLLEIK
24A2K	QQYDDWPT	FGGGTKVEIK
26E9K	QQYNNWPPLT	FGGGTKVEIK
22F5K	QQYHDWPPLS	FGGGTKVEIK
26C10K	QQYDSSPPT	FGGGTKVEIK
17C8K	QQYDDWPPPLT	FGGGTTVEIK
25C9k	QQADSFPWT	FGQGTKVEIK
19E6L	QAWDSSTVV	FGGGTKLTVL
26G2k	QQADSFPWT	FGRGTKVEIK
27G8L (a)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
27G8L (b)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26H3K (c)	QQYDNLPS	FGQGTKLEIK
1A10K (d)	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK

Анализ последовательностей тяжелых цепей

Тяжелая цепь		CDR1	FR2
1A10H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
11E7H1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
11E7H2	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
2F12H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTVT	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
14E4H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
3A5H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
10D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27D8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DNYMS	WIRQAPGKGLEWVS
18A11H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTTLN	DLSIH	WVRQAPGKGLEWMG
20D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
23H6H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26G2H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27G8H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA
26C7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26H3H	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	GYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
19G6H	QVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWIS
22B2H	EVQLVQSGAEVKEPGESEKISCKGSGYIFT	SYWIA	WVRQLPGKGLEWMG
24A2H	QVQLVESGGDLVEPGGSLRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26E9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
19E6H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
22F5H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
25C9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFN	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26C10H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFS	DYYMS	WIRQTPGKGLEWVS
17C8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWLS
1A10H(a)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
27G8H(b)	EVQLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA

Тяжелая цепь	CDR2	FR3
1A10H	GFDPAEGKIIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDTAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
11E7H1	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQNLNLAEDTAVYYCAR
11E7H2	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCAR
2F12H	GFDPDGGETIYAQKFQ	RVTMTEDTSTDTAYMELRSLRSEDTAVYYCTT
14E4H	YISNSGSAIYYADSVKG	RFTISRHNNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCAR
3A5H	GFDPAEGKIIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDTAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
10D7H	YISSTGSAMYDADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
27D8H	YISSSGSATYYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
18A11H	GFDPDGGETIYAQKFQ	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLKSEDTAVYYCAT
20D7H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCAR
23H6H	YISSSGSAMYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26G2H	YISSIGSAIHYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
27G8H	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26C7H	YISRVGSTTYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26H3H	I IYPYDS TRYSPSFQ	QVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMFYCAS
19G6H	YISSSGSTMYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
22B2H	I IDPNDS TRYSPSFQ	QVTISADKSIHTAYLQWSSLKASDTAMYYCAT
24A2H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26E9H	YISSSGSTSYCADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
19E6H	AISSSGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
22F5H	YISSTGSTLYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMDSLRADDAAVYYCTR
25C9H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26C10H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCAR
17C8H	YISNSGSAMYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
1A10H (a)	GFDPAEGKIIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
27G8H (b)	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR

Тяжелая цепь	CDR3	FR4
1A10H	LDFSSWFDP	WGQGTLLVTVSS
11E7H1	DYSSGWFYFDY	WGRGTLVTVSS
11E7H2	EHWNAYAFDI	WGQGTMTVTVSS
2F12H	ESSSAWFDP	WGQGTLLVTVSS
14E4H	DRSSAWDEAFDI	WGQGTMTVTVSS
3A5H	LDFSSWFDP	WGQGTLLVTVSS
10D7H	EFSSGWSYFDY	WGQGTLLVTVSS
27D8H	DYSSGWYFDY	WGQGTLLVTVSS
18A11H	GSSSSWFDP	WGQGTLLVTVSS
20D7H	EHSSGYWYFDL	WGRGALVTVSS
23H6H	EYSSGWYFDY	WGRGTLVTVSS
26G2H	EYSSGWAYFDY	WGQGTLLVTVSS
27G8H	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTVTVSS
26C7H	DYSSGWYFDY	WGQGTLLVTVSS
26H3H	HRLWLGEFPGPLNI	WGQGTMTVTVSS
19G6H	DRSSGLVSFDY	WGQGTLLVTVSS
22B2H	HRLWLGTLPGGFYI	WGQGTMTVTVSS
24A2H	DFSSGYFFDY	WGHGTLVTVSS
26E9H	DYSSGWFYFDY	WGQGTLLVTVSS
19E6H	APYSSSWALGLGMDV	WGQGTTVTVSS
22F5H	EYSSGWFFFDY	WGQGTLLVTVSS
25C9H	EYSSGWAYFDY	WGQGTLLVTVSS
26C10H	DHSSGYWYFDL	WGRGTLVTVSS
17C8H	EYSSGWFFFDY	WGQGTLLVTVSS
1A10H (a)	LDFSSWFDP	WGQGTLLVTVSS
27G8H (b)	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTVTVSS

Аминокислотные последовательности антител далее анализировали для оценки их сходства. Легкие каппа-цепи были выделены в три группы, и далее для каждой группы была разработана консенсусная последовательность. Имелось три антитела с легкими ламбда-цепями, из которых ни одно не характеризовалось достаточной степенью сходства друг с другом, с тем, чтобы можно было сформировать группу родственных последовательностей. Два разработанных варианта варьировали по легкой ламбда-цепи. Тяжелые цепи были распределены по четырем группам, и одна тяжелая цепь была выделена в пятую группу, и для групп 1-4 была разработана консенсусная последовательность. Полученные результаты показаны в приведенных ниже табл. 3(a) и 3(b); консенсусные последовательности показаны в списке последовательностей. Номера в скобках соответствуют SEQ ID NO в списке последовательностей.

Таблица 3(a)

Группировка антител по легкой каппа-цепи с соответствующей тяжелой цепью

Группа 1 по каппа (10 членов)	Группа тяжелой цепи (H1-H5)	Группа 2 по каппа (9 членов)	Группа тяжелой цепи (H1-H5)	Группа 3 по каппа (4 члена)	Группа тяжелой цепи (H1-H5)
20D7K (10)	H1 (38)	11E7K2 (3)	H1 (31)	22B2K (16)	H4 (45)
11E7K1 (2)	H1 (30)	10D7K(7)	H1 (35)	19G6K (15)	H1 (44)
26C10K (20)	H1 (51)	3A5K(6)	H2 (34)	26H3K (14)	H4 (43)
23H6K (11)	H1 (39)	1A10K (1)	H2 (29)	26H3K(c) (27)	H4 (43)
26C7K (13)	H1(42)	25C9K (22)	H1 (50)		
24A2K (17)	H1 (46)	26G2K (24)	H1 (40)		
27D8K (8)	H1 (36)	18A11K (9)	H2 (37)		
22F5 (19)	H1 (49)	2F12K (4)	H2 (32)		
26E9K (18)	H1 (47)	1A10K(d) (28)	H2 (53)		
17C8K (21)	H1 (52)				

Таблица 3(b)

Группировка антител по легкой ламбда-цепи с соответствующей тяжелой цепью

Ламбда цепи (3 антитела, без консенсуса)	Группа тяжелой цепи (H1-H5)
14E4 (5)	H1 (33)
27G8 (12)	H3 (41)
27G8(a) (25)	H3 (54)
27G8(b) (26)	H3 (54)
19E6 (23)	H5 (48)

Границы CDR в консенсусных последовательностях (которые, как указывалось ранее, могут варьировать) были следующими: группа 1 по каппа-цепи CDR1 24-35, CDR2 51-57, CDR3 90-99; группа 2 по каппа-цепи CDR1 24-34, CDR2 51-56, CDR3 89-97; группа 3 по каппа-цепи CDR1 24-34, CDR2 50-56, CDR3 89-97; группа тяжелой цепи 1 CDR 131-35, CDR2 50-66, CDR3 99-110; группа тяжелой цепи 2 CDR 131-35, CDR2 50-66, CDR3 99-107; группа тяжелой цепи 3 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-114; и группа тяжелой цепи 4 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-114.

Пример 3. Функциональные тесты.

В данном примере описаны различные тесты, которые использовались для характеристики антител. Тест на адгезию HUT78.

Для анализа использовали 96-луночные планшеты (например, 96-луночные планшеты Costar® 3368; Corning Incorporated Life Sciences, Lowell MA), в лунки которых вносили для ночной инкубации при температуре 4°C по 20 мкг/мл MAdCAM-1 (или аналогичной концентрации человеческого IgG1 в качестве контроля на вносимое покрытие), разбавленный фосфатным буфером pH 9,0. Далее покрывающую смесь удаляли и лунки планшета блокировали добавлением 100 мкл 3% БСА/ФБР, инкубировали в течение 1 ч или дольше при комнатной температуре. Затем планшеты промывали три раза сбалансированным солевым раствором Хенкса (HBSS).

Клетки HUT78 (клеточная линия Т-клеток лимфомы, которая обладает свойствами Т-клеточной линии с индукторным/хелперным фенотипом; ATCC TIB 161), растили до слияния, осаждали и промывали 3X в HBSS, после чего ресуспендировали в HBSS в соответствующей концентрации с достижением ~30000 клеток в 50 мкл.

Анализируемые антитела разбавляли в два раза до конечной концентрации и затем титровали в соотношении 1:4 в бескальциевой, безмагниевой среде HBSS, содержащей 1% БСА с 1 mM Mn^{2+} . 50 мкл титрованного антитела или контроля добавляли в каждую лунку планшета с VEE дном, после чего вносили по 50 мкл HUT78 клеток. Клетки и антитела инкубировали при температуре 4°C в течение 30 мин, после чего добавляли к лункам планшета с покрытием и инкубировали при 37°C в течение 40 мин. Клетки в лунках с покрытием промывали три раза средой HBSS при комнатной температуре, удаляя HBSS в промежутках между промывками. Слипшиеся клетки подвергали процедуре замораживания-оттаивания с использованием для замораживания температуру -20°C, с последующим добавлением 100 мкл смеси красителя CyQuant® и лизирующего буфера (буфер, использованный в тестах флуоресцентного определения количества клеток, применяемый также в процедурах масштабного скрининга; Molecular Probes®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Флуоресцентный сигнал от каждой лунки оценивали количественно с использованием длины волны возбуждения 485 нм и длины волны эмиссии 530 нм, например, с использованием счетчика для планшета, пригодный для анализа множества меток Tecan GENiosPro (Tecan Group Ltd. Mannedorf, Switzerland).

Тест на адгезию человеческих CD4+ клеток.

В лунки планшетов вносили человеческий MAdCAM-1-Fc или человеческий IgG (3 мкг/мл в 20 mM фосфатном буфере, pH 9,0, 130 mM NaCl), по 100 мкл/лунку, инкубировали при температуре 4°C в течение ночи, затем блокировали блокирующим реагентом в количестве 200 мкл/лунку (3% бычий сывороточный альбумин в ФБР) при комнатной температуре в течение по меньшей мере 2 ч. Затем планшеты промывали три раза буфером для адгезии (30 mM HEPES, pH 7, 120 mM NaCl, 1 mM $MnCl_2$, 10 г/мл человеческого IgG).

Готовили серийные разведения исследуемых антител и добавляли к лункам планшета (35 мкл/лунку); выделяли и вносили CD4⁺ Т-клетки (250000 клеток/35 мкл/лунку), после чего планшеты инкубировали при температуре 4°C в течение 2 ч. После трехкратной промывки буфером для адгезии, планшеты замораживали при температуре -20°C и выдерживали в течение ночи. Затем добавляли реагент для детекции (100 мкл/лунку реагента CyQUANT; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA), и планшеты инкубировали при температуре 37°C в течение 45 мин. Результаты определяли по флуоресценции при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 530 нм.

Показатель EC₅₀ в реакции связывания человеческих CD4+CD45RA Т-клеток памяти.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC; свежие или замороженные и оттаявшие, например, в фосфатно-буферном растворе с 2% ФСТ) промывали и суспендировали в буфере HEPES (30 mM HEPES + 140 mM NaCl) с 1% БСА, при наличии или в отсутствие 1 mM $MnCl_2$ (в зависимости от эксперимента; Mn^{2+} необходим для связывания MAdCAM-1), и вносили в лунки 96-луночных планшетов (10⁶ клеток/лунку). Клетки инкубировали с 10 мкг/мл человеческого IgG в течение 30 мин на льду для блокирования неспецифического связывания. Далее клетки инкубировали с серийными разведениями биотинилированных анти-альфа4бета7 антител в 96-луночных планшетах в течение 1 ч на льду и затем добавляли, в разведении 1:100, смесь стрептавидина-фикоэритрина (PE; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), 4 мкл красителя CD3-Pacific Blue, CD4-PerCP-Cy5.5 и CD45RA-флуоресцеина изотиоцианат (FITC) (BD Biosciences, San Jose CA) до конечного объема 100 мкл, и смесь инкубировали еще в течение 1 ч на льду. Клетки промывали два раза HEPES буфером (при добавлении или в отсутствие $MnCl_2$ соответственно) и затем фиксировали в 200 мкл HEPES буфера плюс 0,5% параформальдегида (также при наличии или в отсутствие $MnCl_2$ соответственно). Определяли процент положительных по связыванию с анти-альфа4бета7 антителом CD4+CD45RA Т-клеток памяти с использованием теста, основанного на сортировке активированных флуоресценцией клеток (FACS), например, с использованием проточного цитометра benchtop BD™ LSR II (BD Biosciences, San Jose CA). Показатель EC₅₀ определяли как концентрацию анти-альфа4бета7 антитела, при которой 50% сайтов альфа4бета7 на клетках памяти CD4CD45RA связываются анти-альфа4бета7 антителом.

Значение IC_{50} при блокировании связывания MAdCAM-1-Fc с человеческими CD4+CD45RA T-клетками памяти PBMC (свежие или замороженные, как было описано ранее) промывали и суспендировали в HEPES буфере (30 mM HEPES+140 mM NaCl) с 1% БСА и 1 mM $MnCl_2$ до конечной концентрации 10^7 клеток/мл. Клетки блокировали по описанной ранее процедуре, после блокирования клетки инкубировали с серийным разведением анти-альфа4бета7 антитела (или использовали соответствующий контроль) в 96-луночных планшетах в течение 30 мин на льду и затем с 0,3 мкг/мл биотинилированного MAdCAM-1-Fc белка еще в течение 1 ч.

После двух промывок в HEPES буфере с содержанием 1 mM $MnCl_2$, клетки обрабатывали с использованием смеси стрептавидина-PE, в разведении 1:100, 4 мкл красителя CD3-Pacific Blue, CD4-PerCP-Cy5.5 и CD45RA-FITC, как описано ранее, в конечном объеме 100 мкл. По окончании 1 ч инкубации на льду, клетки промывали два раза HEPES буфером с 1 mM $MnCl_2$ и затем фиксировали в 200 мкл буфера плюс 0,5% параформальдегида. Процент положительных по связыванию с MAdCAM-1-Fc CD4+CD45RA T-клеток памяти определяли в тесте с использованием сортировщика активированных флуоресценции клеток (FACS), как было описано ранее. Значение IC_{50} определяли как концентрацию анти-альфа4бета7 антитела, при которой связывание MAdCAM-1-Fc с альфа4бета7 на CD4CD45RA-клетках памяти ингибируется на 50%.

Индукция альфа4бета7 ретиновой кислотой на активированных T-клетках.

Выделенные человеческие PBMC активировали с использованием анти-CD3 (связанным с планшетом, 5 мкг/мл), человеческого IL-2 (20 нг/мл), в присутствии или в отсутствие ретиновой кислоты (1000 нМ), в течение 7 дней. Активированные клетки промывали два раза окрашивающим буфером (ФБР плюс 0,5% БСА и 1 mM $MnCl_2$) и инкубировали со 100 мкг/мл человеческого Ig в течение 30 мин для блокирования неспецифического связывания. Вначале клетки инкубировали с серийными разведениями анти-альфа4бета7 антител в течение 30 мин на льду и затем окрашивали с использованием 1 мкг/мл биотинилированного MAdCAM-1-Fc и инкубировали в течение еще 30 мин. После двукратного промывания окрашивающим буфером клетки красили смесью стрептавидин-PE (1:1000) в течение 30 мин. Клетки анализировали с использованием сортировщика активированных флуоресценции клеток, например, в рамках процедуры FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose CA). Клетки, приготовленные таким образом, могут использоваться для дальнейших экспериментов, таких как конкурентные тесты.

Конкурентные тесты.

Анти-альфа-4-бета7 антитела также анализировали на их способность конкурировать с другими анти-альфа4бета7 и/или анти-бета-7 антителами по связыванию с клетками, экспрессирующими альфа4бета7, с использованием методики флуорометрической оценки в микрообъемах, или FMat, по существу как было описано в работе Fiscella, et al., Nature Biotechnology 21:302-307; 2003. В общих чертах, эта процедура состоит в том, что клетки, экспрессирующие высокие уровни альфа4бета7, получали, например, путем временной ко-трансфекции клеток нуклеиновыми кислотами, кодирующими альфа-4, и нуклеиновыми кислотами, кодирующими бета-7. Стабильные клеточные линии получали аналогичным способом с использованием клеток и протоколов, подходящих для стабильной трансфекции. Трансфицированные клетки скринировали, например, в рамках процедуры FACS, с использованием антител против альфа-4, антител против бета-7 и/или против лиганда (т.е. MAdCAM-1, например, белка слияния MAdCAM-1-Fc). Клетки могут подвергаться нескольким циклам сортировки и селекции с образованием клональных клеточных линий с воспроизводимыми повышенными уровнями экспрессии альфа4бета7.

Связывание с S250N мутантом.

Антитела также оценивали на их способность распознавать точечный мутант S250N в бета-7 цепи, который, как известно, является важным для связывания с ACT-1 (J Immunol. 159:1497, 1997). Клетки 293, осуществляющие временную ко-экспрессию альфа4бета7 и имеющие S250N мутацию в бета цепи (ref), получали по способу, аналогичному описанному ранее применительно к получению клеток, экспрессирующих высокие уровни альфа4бета7.

В общих чертах, процедура состояла в том, что в общей сложности собирали 1×10^6 клеток для оценки профиля с использованием раствора для диссоциации клеток и откручивали в центрифуге со скоростью 1000 об/мин в течение 5 мин. Затем клетки блокировали с использованием 0,5 мл блокирующего буфера (1% козьей сыворотки/ФБР) в течение 30 мин-1 ч при температуре 4°C при встряхивании. В случае окрашивания с использованием MAdCAM-1-Fc, клетки инкубировали в течение 1 ч при температуре 4°C при встряхивании в Mn^{2+} -содержащем буфере (1 mM $MnCl_2$ в 30 mM HEPES + 1% козьей сыворотки). Клетки далее откручивали в центрифуге со скоростью 1000 об/мин в течение 5 мин и добавляли 0,5 мл свежего блокирующего буфера с содержанием 10 мкг/мл первичного антитела, с последующей инкубацией в течение 30 мин-1 ч при температуре 4°C при встряхивании. После двух промывок с использованием по 4 мл холодного ФБР (для каждой промывки) добавляли вторичное антитело (т.е. козье анти-IgG-фикоцитрин-конъюгированное антитело; Southern Biotech, в разведении 1:250 или в концентрации 0,1 мкг/ 10^6 клеток) в 0,5 мл блокирующего буфера, и клетки инкубировали в течение 20-30 мин при температуре 4°C. В конце процедуры, клетки промывали еще один раз с использованием 4 мл холодного ФБР и затем ресуспендировали в 0,5 мл FACS-буфера в расчете на профиль. Связывание с однонуклео-

тидными полиморфами (SNP) Для SNP анализа $\alpha 4$ субъединицы, $\alpha 4$ генные экзоны 1-28 от 90 индивидуумов (180 гаплоидных геномов), отражающих разные этнические группы, амплифицировали в рамках полимеразной цепной реакции (ПЦР) и затем секвенировали. Идентифицировали три возможных SNP в кодирующем участке $\alpha 4$ гена и в одном из трех было выявлено аминокислотное замещение (Arg878Gln). Аналогично, для SNP анализа (37 субъединицы, кодирующий участок (37 генных экзонов 2-15 от 90 индивидуумов (180 гаплоидных геномов), отражающих разные этнические группы, подвергли ПЦР амплификации и впоследствии секвенировали. Было идентифицировано три SNP и в двух из них идентифицированы аминокислотные изменения. Далее, сравнили данные по SNP анализу, полученные в местной лаборатории с информацией в базе данных NCBI (NCBI: National Center for Biotechnology Information (Национальный Центр биотехнологической информации), подразделение National Library of Medicine (Национальной медицинской библиотеки) (NLM) при National Institutes of Health (Национальном Институте здоровья) (NIH)). Только A/G мутация, приводящая к Gln878Arg в субъединице $\alpha 4$, происходит с высокой частотой: 20% или 30%, как по данным SNP анализа в местной лаборатории, так и по информации, имеющейся в базе данных соответственно. Другие SNP встречаются с низкой частотой. Полученная информация проиллюстрирована в приведенной ниже табл. 4.

Таблица 4

Частота SNP в человеческих бета-7 и альфа-4 субъединицах

	База данных SNP	Частота альтернативных аллелей база данных NCBI database	Частота альтернативных аллелей: внутренний анализ	Локализация
Бета7	E97V	не оценивали	A(0,989)/T(0,019)	внеклеточная
	R213S	C(0,975)/A(0,25)	нет данных	внеклеточная
	G611E	не оценивали	нет данных	внеклеточная
	G629S	не оценивали	A(0,989)/T(0,019)	внеклеточная
	H672Y	не оценивали	нет данных	Внеклеточная
альфа4	V824A	T(0,972)/C(0,028)	нет данных	внеклеточная
	Q878R	A(0,648)/G(0,352)	A(0,783)/G(0,217)	внеклеточная
	R1007S	NA	нет данных	внутриклеточная

Были разработаны конструкции точечных мутантов, отражающие SNP аминокислотных замен (a4b7(E97V); a4b7(R213S); a4b7(G629S); a4(V824A)b7; a4(Q878R)b7) во внеклеточных доменах альфа4 и бета7 субъединиц. Каждая конструкция точечного мутанта была трансфицирована в клетки 293, вместе с конструкцией экспрессии, соответствующей варианту дикого типа. Трансфицированные клетки 293 вначале окрашивали с использованием 1 мкг/мл человеческого IgG или анти-альфа4бета7 антитела, промывали ФБР и окрашивали фикоэритрином, конъюгированным со вторичным козым антителом против человеческого IgG. После промывки в ФБР клетки анализировали с использованием сортировщика активированных флуоресценцией клеток, например, FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose CA). Интенсивность флуоресцентного окрашивания (геометрическое среднее значение) для каждого окрашенного антитела показана в приведенной ниже табл. 5.

Таблица 5

Связывание с SNP

	дикий тип	E97V	R213S	G629S	V824A	Q878R
IRG	8	7	7	7	7	7
1A10	122	135	31	80	102	70
3A5	124	135	31	80	110	71
2F12	129	134	37	80	112	73
18A11	92	105	30	63	82	56
22B2	97	108	58	65	85	58
26H3	93	106	49	62	82	55
27G8	102	116	59	68	88	58
26G2	99	113	38	64	86	58
17C8	93	96	49	58	74	51
19G6	94	108	46	59	67	46
25C9	96	106	33	59	77	51

Приведенные результаты показывают, что все исследованные антитела связывались с известными SNP для альфа4бета7.

В нескольких разных тестах сравнивали активности различных антител, специфичных для гетеродимера альфа4бета7, и результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Характеристики антител против альфа4бета7

Антитело	Адгезия с HUT78, IC ₅₀ (нг/мл)	Конкуренция с MAdCAM-1, IC ₅₀ (нг/мл)	Связывание с CD4+CD45RA- клетками, EC50 (нг/мл)	Связывание с a4b7 (S250N)
1A10	6,1	6,2	4,9	–
3A5	7,5	6,2	5,6	–
2F12	11,4	4,6	3,3	.
18 A11	7,4	7,3	4,7	–
22B2	3,7	23,2	5,1	–
26H3	8,9	14,1	9,3	–
27G8	14,9	8,7	6,3	.
26G2	6,9	99,6	32,6	+
17C8	6,8	31,1	22,9	+
19G6	12,2	103,3	32,9	+
25C9	13,7	77,6	не оценивали	+

Soler et al. сообщили о выявлении специфичности по связыванию для гуманизированного анти-альфа4бета7 антитела, известного как ведолизумаб (J Pharmacol Exp Ther 330:864; 2009). Было показано, что это антитело характеризуется показателем EC₅₀ для CD4+ Т-лимфоцитов памяти на уровне 0,042 мкг/мл (42 нг/мл). Ведолизумаб также ингибировал связывание растворимого MAdCAM-1 с альфа4бета7hi Т-клетками памяти с показателем IC₅₀, равным 0,034 мкг/мл (34 нг/мл). Тогда как многие антитела, приведенные в табл. 6, имеют показатель EC₅₀ для Т-клеток памяти (т.е. для CD4+CD45RA клеток) менее чем 10 нг/мл, и все имеют показатель EC₅₀ менее чем 35 нг/мл (все также характеризуется показателем EC₅₀ выше чем 0,1 нг/мл, в данном тесте). Дополнительно, несколько антител, показанных в табл. 6, демонстрировали значение IC₅₀ в конкурентном тесте с MAdCAM менее чем 10 нг/мл, и многие имели показатель IC₅₀ менее чем 30 нг/мл (все также имели показатель IC₅₀ выше чем 0,1 нг/мл в данном тесте). Хотя Soler et al. не отметили способность ведолизумаба связываться с S250N мутантом альфа4бета7, известно, что мышинное антитело ACT-1, из которого получен ведолизумаб, не способно связываться с S250N мутантом (Tidswell et al., J Immunol 159:1497; 1997), и согласно данным Soler et al., ведолизумаб и ACT-1 демонстрируют одинаковую антигенную специфичность. Таким образом, ведолизумаб также не связывается с мутантом S250N, в отличие от нескольких антител, показанных в табл. 6.

Пример 4. Дополнительный анализ.

Было выбрано несколько репрезентативных антител с разными свойствами, определяемыми в указанных выше функциональных тестах, для дополнительного анализа, который будет описан далее.

Аффинность по связыванию с человеческим a4b7.

Для определения аффинности человеческих анти-альфа4бета7 антител по связыванию с клетками, проводили тест по оценке кинетики исключения, который позволяет измерять связывание в фазе раствора, что, в свою очередь, можно использовать для вычисления равновесной константы диссоциации K_d. Был использован метод KinExA® Technology (Sapidyne Instruments, Boise, ID), проводимый по существу по процедуре, описанной Xie et al. J. Imm. Methods 304:1 (2005) и Rathanaswami et al. Anal. Biochem. 373:52 (2008). В общих чертах, процедура тестирования состояла в том, что HUT78 клетки, экспрессирующие человеческий альфа4бета7, титровали в соотношении 1:3 и в количестве от примерно 50⁶ клеток/мл до примерно 400 клеток/мл и затем уравнивали с использованием в конечной концентрации 2 или 30 пМ мАт 2F12 или 18A11, или 30 или 500 пМ для антитела 17C8, в течение 18 ч при температуре 4°C. Уровень свободного антитела, остающегося в супернатанте в состоянии равновесия, определяли по методике KinExA® при пропускании супернатанта через шарики РММА, на которые был нанесен козий Fc против человеческого антигена, и детектировали с использованием козьего (H+L) Cy5 против человеческого антигена (по существу, как описано в работе Rathanaswami et al. Biochem Biophys Research Commun:1004 (2005). Значение константы равновесной диссоциации (K_d) получали с использованием программного обеспечения KinExA®, проводя "анализ n-кривой", обобщающей все приведенные кривые с получением одного значения K_d (Rathanaswami et al. 2005 and Xie et al., supra); результаты показаны в табл. 7.

Таблица 7

Аффинность по связыванию антител

Антитело	Kd (пМ)	Соотношение (низкое значение Ат)	% ошибки	Kd, низкое значение	Kd, высокое значение
2F12	4,56	0,44	3,80	1,94	11,12
18A11	0,90	2,22	4,40	0,23	2,29
17C8	29,36	1,02	3,58	12,09	74,53

Указанные антитела демонстрировали значение Kd в тесте KinExA® более чем 0,05 пМ, но менее чем 80 пМ, менее чем 15 пМ или менее чем 5 пМ.

Показатели ФК/ФД.

Фармакокинетическое (ФК) и фармакодинамическое (ФД) исследование однократной дозы трех полностью человеческих анти-альфа4бета7 антител у самцов яванского макака проводили после внутривенного (в/в; 5 мг/кг) или подкожного (п/к; 0,5 или 5 мг/кг) введения. Были выявлены аналогичные исходные ФК данные (C_0 ; концентрация в нулевой временной точке) и показатели распределения в центральном кровотоке после в/в введения дозы 5 мг/кг. После п/к введения, и показатель C_{max} (максимальная концентрация в сыворотке), и значение AUC (площадь под кривой концентрация-время) демонстрировали пропорциональную дозозависимость в диапазоне введенных доз 0,5-5 мг/кг, при п/к введении, для всех трех антител. Абсолютная биодоступность после п/к введения трех исследуемых антител варьировала от 44 до 68%.

Количественное определение свободных альфа4бета7 на Т-клетках до и после лечения антителом проводили с использованием РЕ-конъюгированного анти-альфа4бета7 антитела 27G8. Базовый уровень контролировали с использованием окрашивания РЕ-конъюгированным анти-альфа4бета7 антителом 27G8 в присутствии 10 мг/мл антитела, при тестировании до и после лечения антителом. Функциональное насыщение определяли по проценту свободных сайтов альфа4бета7, в сравнении с вариантами, получаемыми при проведении предварительной обработки каждым из антител. Использовали CD4-PerCP, CD99-APC и CD28-FITC для разграничения "необученных", центральных и эффекторных клеток памяти. Было выявлено фракционное насыщение при добавлении альфа4бета7 к "необученным" Т-клеткам, из-за вариабельности и ограниченной чувствительности в популяции клеток памяти у яванского макака. В случае варианта лечения 18A11, все три группы дозирования демонстрировали насыщение в период от 1 дня до 14 дня. На 29 день, все три группы утратили насыщающую способность. При лечении как в варианте 2F12, так и 17C8, потеря насыщающей способности для мишени наблюдалась на 14 день при использовании в группе низкой дозировки (0,5 мг/кг).

Кроме выявления уровня свободного альфа4бета7, проводили также определение степени насыщения мишени путем окрашивания ПЭ-конъюгированным антителом A35 против антигена человека, в отсутствие или в присутствии 10 мг/мл антитела. Общее число сайтов для альфа4бета7 оценивали при проведении предварительной инкубации образцов с 10 г/мл анти-альфа4бета7 с последующим окрашиванием антителом против антигена человека. Насыщение мишени определяли по проценту общего числа сайтов альфа4бета7, занятых анти-альфа4бета7 антителами, для каждого образца. Для трех полностью человеческих анти-альфа4бета7 антител было продемонстрировано насыщение альфа4бета7, которое сохранялось в среднем на уровне 81-100% в течение 14 дней после в/в введения дозы 5 мг/кг.

ФК/ФД моделирование проводили на основе концентраций сывороточного анти-альфа4бета7 антитела и данных по насыщению соответствующего рецептора альфа4бета7 с использованием модели для прямой оценки E_{max} . Полученные в рамках данной модели ФД параметры представляли собой следующие: E_{max} (максимальное насыщение рецептора альфа4бета7), равное 92%, EC_{50} (концентрация анти-альфа4бета7 антитела, при которой достигается 50% значение E_{max}), равная 52 нг/мл, и E_0 (начальное насыщение рецептора альфа4бета7), равное 18%. Все три антитела продемонстрировали мощные ФД эффекты in vivo в отношении насыщения рецепторов альфа4бета7 со средним значением параметра $t_{1/2}$, составляющим ~3-5 дней у яванского макака.

Список последовательностей

<110> AMGEN INC.
 HSU, Hailing
 FOLTZ, Ian
 ARORA, Taruna
 JACOBSEN, Frederick W.

<120> АНТИТЕЛО-АНТАГОНИСТ, СПЕЦИФИЧНОЕ ДЛЯ ГЕТЕРОДИМЕРА АЛЬФА-4-БЕТА-7

<130> A-1459-WO-PCT

<140> PCT/US2010/027422
 <141> 2010-03-16

<150> 61/306,829
 <151> 2010-02-25

<150> 61/162,154
 <151> 2009-03-20

<160> 72

<170> Патентин, версия 3.5

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

034783

100

105

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

034783

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

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

Phe Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

034783

```

50              55              60

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

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

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

<210>  8
<211> 106
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  8

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

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

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

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

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

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

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

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

<400>  9

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

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

```

034783

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys
100 105

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

034783

```

1             5             10             15

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

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

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

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

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

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

<210>  12
<211>  110
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  12

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Asn Asn
      20             25             30

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

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

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
      65             70             75             80

Ser Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Thr Ala Trp Asp Asp Ser Leu
      85             90             95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100            105            110

<210>  13
<211>  106

```

034783

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

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

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

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

034783

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

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

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

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

034783

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

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

<210> 17
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Cys Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

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

034783

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

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

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

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

<210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Asp Trp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

034783

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Ser Gln Ser Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

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

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

<210> 21
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

034783

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

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

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

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

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 24

034783

<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Ala Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Thr Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

034783

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Ala Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Thr Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro

034783

65 70 75 80

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

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

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu
20 25 30

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

034783

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Asp Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Leu Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

034783

<400> 31

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Val Thr Asp Leu
20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Gln Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

034783

Thr Thr Glu Ser Ser Ser Ala Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Ser Ser Ala Trp Asp Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu
20 25 30

034783

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

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Asp Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Leu Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Gly Ser Ala Met Tyr Asp Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36

034783

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Asp Leu
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Gln Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

034783

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

Ala Thr Gly Ser Ser Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Ser Ser Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

034783

```

                20                25                30

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Met Tyr Ser Ala Asp Ser Val
    50                55                60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115                120

<210>  40
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  40

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ile Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
    50                55                60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115                120

```

034783

<210> 41
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 42
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Val Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

034783

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser His Arg Leu Trp Leu Gly Glu Phe Pro Gly Pro Leu Asn Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

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

034783

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asp Pro Asn Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr His Arg Leu Trp Leu Gly Thr Leu Pro Gly Gly Phe Tyr Ile
100 105 110

034783

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Phe Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Cys Ala Asp Ser Val

034783

```

50              55              60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

<210>  48
<211> 124
<212>  PRT
<213> Homo sapiens

<400>  48

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50     55     60

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

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

Ala Lys Ala Pro Tyr Ser Ser Ser Trp Ala Leu Gly Leu Gly Met Asp
100    105    110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115    120

<210>  49
<211> 120
<212>  PRT
<213> Homo sapiens

<400>  49

```


034783

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Gly Ser Thr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

034783

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp His Ser Ser Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

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

034783

Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu
20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 125
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55

<211> 109

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Консенсусная последовательность легкой цепи

<220>

<221> Дополнительная особенность

<222> (2)..(2)

<223> X может быть Val, Leu или Ile

<220>

<221> Дополнительная особенность

<222> (3)..(3)

<223> X может быть Met или Val

<220>

<221> Дополнительная особенность

<222> (4)..(4)

<223> X может быть Met или Leu

<220>

<221> Дополнительная особенность

<222> (5)..(5)

<223> X может быть Met или Thr

```

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (9)..(9)
<223> X может быть Ala или Gly

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (13)..(13)
<223> X может быть Leu или Val

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (14)..(14)
<223> X может быть Phe или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (18)..(18)
<223> X может быть Gly, Arg или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (21)..(21)
<223> X может быть Val или Leu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (28)..(28)
<223> X может быть Thr или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (30)..(30)
<223> X может быть thr, Asn или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (30)..(30)
<223> X может быть Thr, Asn или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (31)..(31)
<223> X может быть Thr, Asp или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (32)..(32)
<223> X может быть Asn, Asp или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (33)..(33)
<223> X может быть Tyr или ничего

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (35)..(35)
<223> X может быть Val или Ala

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (40)..(40)

```

<223> X может быть Ser или Lys

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (42)..(42)
 <223> X может быть Ser или Gly

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (44)..(44)
 <223> X может быть Ser, Pro или Ala

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (50)..(50)
 <223> X может быть Phe или Tyr

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (54)..(54)
 <223> X может быть Thr, Ala или Ser

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (61)..(61)
 <223> X может быть Ala или Asp

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (71)..(71)
 <223> X может быть Glu или Asp

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (78)..(78)
 <223> X может быть Ser или Arg

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (80)..(80)
 <223> X может быть Gln или Glu

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (81)..(81)
 <223> X может быть Pro или Ser

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (88)..(88)
 <223> X может быть Phe, Cys или Tyr

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (93)..(93)
 <223> X может быть His, Asn или Asp

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (94)..(94)
 <223> X может быть Asp, Asn, Tyr или Ser

 <220>
 <221> Дополнительная особенность

```

<222> (95)..(95)
<223> X может быть Trp или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (97)..(97)
<223> X может быть Pro или ничего

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (98)..(98)
<223> X может быть Val, Leu или ничего

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (99)..(99)
<223> X может быть Thr или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (102)..(102)
<223> X может быть Gln или Glu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (105)..(105)
<223> X может быть Arg, Thr или Lys

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (106)..(106)
<223> X может быть Leu или Val

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (107)..(107)
<223> X может быть Glu или Ala

<400> 55

Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Ser Pro Xaa Thr Leu Ser Xaa Xaa Pro Gly
1          5          10         15

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

Xaa Leu Xaa Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Xaa Gln Xaa Pro Arg Leu Leu
35          40          45

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

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

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

```

Xaa Xaa Xaa Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Ile Lys
 100 105

<210> 56
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Консенсус легкой цепи

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (11)..(11)
 <223> X может быть Val или Leu

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (12)..(12)
 <223> X может быть Ser или Phe

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (15)..(15)
 <223> X может быть Val или Ile

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (28)..(28)
 <223> X может быть Asp или Gly

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (29)..(29)
 <223> X может быть Ile или Val

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (30)..(30)
 <223> X может быть Ser, Ile, Asn или Arg

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (31)..(31)
 <223> X может быть Ser или Asn

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (32)..(32)
 <223> X может быть Trp или Tyr

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (38)..(38)
 <223> X может быть Arg или Gln

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (42)..(42)
 <223> X может быть Lys, Met или Thr

<220>


```

<221> Дополнительная особенность
<222> (43)..(43)
<223> X может быть Ala или Val

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (45)..(45)
<223> X может быть Lys или Asn

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (46)..(46)
<223> X может быть Val или Leu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (49)..(49)
<223> X может быть Tyr или Phe

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (50)..(50)
<223> X может быть Ser, Ala или Gly

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (51)..(51)
<223> X может быть Ala или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (53)..(53)
<223> X может быть Ser, Ile, Asn или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (55)..(55)
<223> X может быть Gln или Glu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (56)..(56)
<223> X может быть Ser или Asn

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (60)..(60)
<223> X может быть Ser или Leu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (65)..(65)
<223> X может быть Ser или Arg

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (72)..(72)
<223> X может быть Ala или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (76)..(76)
<223> X может быть Ser или Asn

```

```

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (83)..(83)
<223> X может быть Phe или Val

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (85)..(85)
<223> X может быть Thr или Asn

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (87)..(87)
<223> X может быть Tyr или Cys

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (90)..(90)
<223> X может быть Gln или Lys

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (91)..(91)
<223> X может быть Ala, Val или Tyr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (92)..(92)
<223> X может быть Asp или Asn

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (94)..(94)
<223> X может быть Phe или Ala

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (96)..(96)
<223> X может быть Trp, Gly или Phe

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (100)..(100)
<223> X может быть Gln, Arg или Pro

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (103)..(103)
<223> X может быть Lys или Asn

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (105)..(105)
<223> X может быть Glu или Asp

<400> 56

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

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

```

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

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

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

Glu Asp Xaa Ala Xaa Tyr Xaa Cys Gln Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Pro Xaa
 85 90 95

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

<210> 57
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Консенсус легкой цепи

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (2)..(2)
 <223> X может быть Ile или Val

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (22)..(22)
 <223> X может быть Ser или Thr

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (30)..(30)
 <223> X может быть Ser, Asn или Thr

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (31)..(31)
 <223> X может быть Asn, Thr или Asp

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (43)..(43)
 <223> X может быть Ala или Val

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (51)..(51)
 <223> X может быть Ala или Thr

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (56)..(56)
 <223> X может быть Thr или Ala

```

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (76)..(76)
<223> X может быть Asp или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (77)..(77)
<223> X может быть Gly или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (87)..(87)
<223> X может быть Phe или Tyr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (91)..(91)
<223> X может быть Phe или Tyr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (93)..(93)
<223> X может быть Asp или Ile

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (96)..(96)
<223> X может быть Cys, Ser, Ile или Tyr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (97)..(97)
<223> X может быть Ser или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (103)..(103)
<223> X может быть Lys, Arg или Asp

<400> 57

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

Asp Arg Val Thr Ile Xaa Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Xaa Xaa Tyr
20          25          30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Xaa Asp Xaa Leu Pro Xaa

```

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

<210> 58
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Консенсусная последовательность тяжелой цепи

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (10)..(10)
 <223> X может быть Gly или Asp

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (13)..(13)
 <223> X может быть Lys или Glu

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (23)..(23)
 <223> X может быть Thr, Val или Ala

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (30)..(30)
 <223> X может быть Ser, Arg или Asn

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (32)..(32)
 <223> X может быть Tyr или Asn

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (40)..(40)
 <223> X может быть Ala или Thr

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (48)..(48)
 <223> X может быть Val, Ile или Leu

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (53)..(53)
 <223> X может быть Ser, Arg или Asn

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (54)..(54)
 <223> X может быть Ser, Thr, Val или Ile

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (57)..(57)

<223> X может быть Ala, Thr или Val
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (58)..(58)
 <223> X может быть thr, Val, Met, Ile, Leu или Ser
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (59)..(59)
 <223> X может быть Tyr или His
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (60)..(60)
 <223> X может быть Tyr, Ser, Asp или Cys
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (73)..(73)
 <223> X может быть Asp, Val или His
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (75)..(75)
 <223> X может быть Ala или Pro
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (76)..(76)
 <223> X может быть Lys или Arg
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (83)..(83)
 <223> X может быть Met или Leu
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (84)..(84)
 <223> X может быть Asp, Asn или Ser
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (89)..(89)
 <223> X может быть Glu или Asp
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (91)..(91)
 <223> X может быть Thr или Ala
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (94)..(94)
 <223> X может быть Phe или Tyr
 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (97)..(97)
 <223> X может быть Ala или Thr
 <220>
 <221> Дополнительная особенность

```

<222> (99)..(99)
<223> X может быть Glu или Asp

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (100)..(100)
<223> X может быть His, Tyr, Phe или Arg

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (103)..(103)
<223> X может быть Gly или Ala

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (104)..(104)
<223> X может быть Tyr, Trp или Leu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (105)..(105)
<223> X может быть Asp или ничего

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (106)..(106)
<223> X может быть Trp, Ala, Phe, Tyr, Ser, Val или Glu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (107)..(107)
<223> X может быть Tyr, Phe, Ser или Ala

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (109)..(109)
<223> X может быть Asp или Glu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (110)..(110)
<223> X может быть Leu, Tyr, Ser или Ile

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (113)..(113)
<223> X может быть Arg, Gln или His

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (115)..(115)
<223> X может быть Ala или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (116)..(116)
<223> X может быть Leu или Met

<400> 58

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

```

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

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Xaa Xaa Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Xaa Xaa Ser Leu Arg Ala Xaa Asp Xaa Ala Val Xaa Tyr Cys
 85 90 95

Xaa Arg Xaa Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Gly
 100 105 110

Xaa Gly Xaa Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 59
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Консенсусная последовательность тяжелой цепи

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (29)..(29)
 <223> X может быть Leu или Val

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (30)..(30)
 <223> X может быть Asp, Thr или Ser

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (34)..(34)
 <223> X может быть Met или Ile

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (54)..(54)
 <223> X может быть Ala или Gln

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (55)..(55)
 <223> X может быть Glu или Asp

<220>
 <221> Дополнительная особенность


```

<222> (57)..(57)
<223> X может быть Lys или Glu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (58)..(58)
<223> X может быть Ile или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (60)..(60)
<223> X может быть Ser или Tyr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (66)..(66)
<223> X может быть Asp или Gly

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (72)..(72)
<223> X может быть Asp, Arg или Glu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (77)..(77)
<223> X может быть Asp или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (79)..(79)
<223> X может быть Ala или Val

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (84)..(84)
<223> X может быть Ser или Arg

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (87)..(87)
<223> X может быть Arg или Lys

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (91)..(91)
<223> X может быть Ser или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (97)..(97)
<223> X может быть Ala или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (98)..(98)
<223> X может быть Thr или Arg

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (99)..(99)
<223> X может быть Leu, Glu или Gly

<220>

```

<221> Дополнительная особенность
 <222> (100)..(100)
 <223> X может быть Asp или Ser

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (101)..(101)
 <223> X может быть Phe или Ser

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (103)..(103)
 <223> X может быть Ser или Ala

<400> 59

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Xaa Xaa Asp Leu
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Ile Xaa Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Xaa Arg Val Thr Met Thr Xaa Asp Thr Ser Thr Xaa Thr Xaa Tyr
 65 70 75 80

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 60
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Консенсусная последовательность тяжелой цепи

<220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (13)..(13)
 <223> X может быть Gln или Lys

<220>
 <221> Дополнительная особенность

<222> (16)..(16)
 <223> X может быть Gly или Arg

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (89)..(89)
 <223> X может быть Glu или Asp

 <400> 60

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

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

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

 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

 <210> 61
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> Консенсусная последовательность тяжелой цепи

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (13)..(13)
 <223> X может быть Lys или Glu

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (28)..(28)
 <223> X может быть Ser или Ile

 <220>
 <221> Дополнительная особенность
 <222> (31)..(31)

```

<223> X может быть Gly или Ser

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (35)..(35)
<223> X может быть Gly или Ala

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (40)..(40)
<223> X может быть Met или Leu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (52)..(52)
<223> X может быть Tyr или Asp

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (54)..(54)
<223> X может быть Tyr или Asn

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (77)..(77)
<223> X может быть Asn или His

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (94)..(94)
<223> X может быть Phe или Tyr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (98)..(98)
<223> X может быть Ser или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (105)..(105)
<223> X может быть Glu или Thr

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (106)..(106)
<223> X может быть Phe или Leu

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (109)..(109)
<223> X может быть Pro или Gly

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (110)..(110)
<223> X может быть Leu или Phe

<220>
<221> Дополнительная особенность
<222> (111)..(111)
<223> X может быть Asn или Tyr

<400> 61

```

034783

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Xaa Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Xaa Tyr Cys
85 90 95

Ala Xaa His Arg Leu Trp Leu Gly Xaa Xaa Pro Gly Xaa Xaa Xaa Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> FLAG (зарегистрированная торговая марка) пептид

<400> 62

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 63
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 63
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agctggtag cctgggatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caaattacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 64
 <211> 354
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 caggtccagc tgggtacagc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ttcccgata caccctcagt gatttatcca tccactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagt gatgggaggt ttgtatcctc aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgcgc aacggggagc 300
 agctcgtcct ggttcgacct ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354

<210> 65
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctcccgggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcaacttag tctggtatca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catttatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtg tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagctc 240
 gaagatattg cagtttatta ctgtcagcaa tatgatgact ggccctccgt cactttcggc 300
 ggagggacca cgggtggagat caaa 324

<210> 66
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
 ccagggaaag ggctggagtg gctttcatac attagtaata gtggtagtg catgtactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaggaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt actactgtgc gagagagtat 300
 agcagtggct ggttcttctt tgagtcctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctctagt 360

<210> 67
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 67

034783

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtttgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtca ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaatctcct gatctatggt gcatccagtt tacaaaaatgg ggtcccatta      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtaggac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa a                                         321

```

```

<210> 68
<211> 354
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 68
caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg tttccggata caccgtcact gatttatcca tgcactgggt gcgacaggct      120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt ttgtatcctc aagatgggtga aacaatctac      180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac      240
atggagctga gaagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtac aacagaaagc      300
agctcggcct ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt          354

```

```

<210> 69
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 69
cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcacg tccccccat ctgatgagca gttgaaatct      60
ggaactgcct ctgttggttg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag      120
tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag      300
agcttcaaca ggggagagtg ttga                                         324

```

```

<210> 70
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 70

```

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1          5          10          15

```

```

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20          25          30

```

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 71
 <211> 981
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 120
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgctg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aaatgttgctg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggacacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggagggtgc ataagccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctacccca ggcacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggc gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tcctgtcttc cgggtaaatg a 981

<210> 72

034783

<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, имеющий переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 9.

2. Выделенный антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, по п.1, в котором переменная область легкой цепи по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 9 и переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 37.

3. Выделенный антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, по п.2, в котором переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 9 и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 37.

4. Выделенный антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, по п.1, который также включает константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи.

5. Выделенный антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, по п.4, в котором указанная константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из:

- a) константной области легкой цепи каппа-типа;
- b) константной области легкой цепи ламбда-типа;

и указанная константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из:

- a') константной области IgD-антитела;
- b') константной области IgE-антитела;
- c') константной области IgM-антитела;
- d') константной области IgG1-антитела;
- e') константной области IgG2-антитела;
- f') константной области IgG3-антитела;
- g') константной области IgG4-антитела и
- h') константной области IgG4-антитела, содержащей по меньшей мере одну мутацию в шарнирной области, которая облегчает возможность создания дисульфидной связи внутри H-цепи.

6. Выделенный антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, по п.5, в котором указанная константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из:

- a) полипептида, включающего SEQ ID NO: 70;
- b) полипептида, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 70;
- c) полипептида с последовательностью SEQ ID NO: 70, из которой были удалены одна, две, три, четыре или пять N-концевых и/или C-концевых аминокислот;
- d) полипептида по пунктам a), b) или c), который включает одну или несколько посттрансляционных модификаций,

и указанная константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из:

- a') полипептида, включающего SEQ ID NO: 72;
- b') полипептида, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 72;
- c') полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70, из которой были удалены одна, две, три, четыре или пять N-концевых и/или C-концевых аминокислот;
- d') полипептида по пунктам a'), b') или c'), который включает одну или несколько посттрансляционных модификаций.

7. Выделенный антигенсвязывающий белок, специфичный для гетеродимера альфа4бета7, по п.1, в котором указанная переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 9 и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 37.

8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-7.
9. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п.8.
10. Выделенная клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная вектором по п.9.
11. Способ получения антигенсвязывающего белка, включающий культивирование клетки-хозяина по п.10 в условиях, которые способствуют экспрессии, и восстановление белка из культуральной среды.
12. Фармацевтическая композиция для ингибирования по меньшей мере одной активности альфа4бета7, включающая полипептид по любому из пп.1-7 и физиологически приемлемый разбавитель, эксципиент или носитель.
13. Способ ингибирования по меньшей мере одной активности альфа4бета7, включающий приведение в контакт клетки, экспрессирующей альфа4бета7, с антигенсвязывающим белком, специфичным для гетеродимера альфа4бета7, по любому из пп.1-7.
14. Способ ингибирования адгезии клеток, экспрессирующих альфа4бета7, к тканям, содержащим клетки, экспрессирующие MAdCAM-1, который включает приведение в контакт клеток, экспрессирующих альфа4бета7, с антигенсвязывающим белком, специфичным для гетеродимера альфа4бета7, по любому из пп.1-7.
15. Способ лечения индивидуума, имеющего воспалительное заболевание кишечника, где указанный способ включает введение индивидууму композиции по п.12 в количестве, достаточном для ингибирования транспорта клеток, экспрессирующих альфа4бета7, в ткани, включая клетки, экспрессирующие MAdCAM-1.
16. Способ по п.15, в котором указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из язвенного колита, болезни Крона, болезни глютеновой недостаточности (нетропической спру), энтеропатии, ассоциированной с серонегативными артропатиями, микроскопического или коллагенозного колита, эозинофильного гастроэнтерита и воспаления резервуара, возникшего после проктоэктомии и илеоанального анастомоза.
17. Способ по п.15, в котором указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из панкреатита, инсулин-зависимого сахарного диабета, мастита, холецистита, холангита, перихолангита, хронического бронхита, хронического синусита, астмы или болезни "трансплантат против хозяина".

