

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036324**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.27

(21) Номер заявки
201790590

(22) Дата подачи заявки
2015.09.10

(51) Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 9/99 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

**(54) ГУМАНИЗИРОВАННОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, ИНГИБИРУЮЩЕЕ
ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СОСУДИСТО-ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ**

(31) 2014-184710

(32) 2014.09.11

(33) JP

(43) 2017.08.31

(86) PCT/JP2015/075668

(87) WO 2016/039402 2016.03.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИНОГИ ЭНД КО., ЛТД. (JP)

(72) Изобретатель:
**Наито Соити, Анно Хироаки,
Накамура Эцуо, Имаи Сунао, Ямане
Содзи (JP)**

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

(56) WO-A1-2013054830

GRIFFON N. et al., Identification of the Active Form of Endothelial Lipase, a Homodimer in a Head-to-Tail Conformation, The Journal of Biological Chemistry, 2009, Vol. 284, No. 35, p. 23322-23330, FIGURE 7, page 23322, right column, lines 21 to 25

HIRATA K. et al., Cloning of a Unique Lipase from Endothelial Cells Extends the Lipase Gene Family, The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274, No. 20, p. 14170-14175, FIG. 1, page 14171, right column to page 14172, right column, paragraph of "Cloning and Sequence Analysis of EDL"

GRIFFON N. et al., Substrate specificity of lipoprotein lipase and endothelial lipase: studies of lid chimeras, Journal of Lipid Research, 2006, Vol. 47, p. 1803-1811, Fig. 1

TILBEURGH H.V. et al., Lipoprotein Lipase, The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 6, p. 4626-4633, page 4629, paragraph of "The P5-Loop"

WO-A1-2014142182

(57) Предусматривается гуманизованное моноклональное антитело или его фрагмент, которые селективно ингибируют ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы, и фармацевтические композиции, содержащие их в качестве активного ингредиента, пригодные для лечения артериосклероза или метаболического синдрома.

036324
B1

036324
B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к гуманизированному моноклональному антителу, которое ингибирует ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы (далее также обозначаемой как EL), и к фармацевтическим композициям, содержащим его. Более конкретно, настоящее изобретение относится к гуманизированному моноклональному антителу, которое селективно ингибирует ферментативную активность EL, или к его фрагменту и к фармацевтической композиции, содержащей их.

Уровень техники

EL представляет собой фосфолипазу, которая принадлежит семейству триглицеридлипаз (далее обозначаемых как TG) (непатентный документ 1). EL человека состоит из 500 аминокислот (номер доступа NCBI NP 006024.1, SEQ ID NO: 1). EL не являющегося человеком животного включают EL кролика (номер доступа NCBI NO 001182567, SEQ ID NO: 2), EL яванского макака (номер доступа NCBI EHH61805.1), EL павиана (номер доступа NCBI XP 003914420. 1) и EL мыши (номер доступа NCBI NP 034850.3). К семейству TG относится липопротеинлипаза (далее обозначаемая как LPL) и печеночная липаза (далее обозначаемая как HL).

Анализ мышей с нокаутом EL и мышей с трансгенной EL показал, что EL связана с метаболизмом HDL-холестерина (далее обозначаемого как HDL-с) вследствие ее выраженной фосфолипазной активности, и она привлекает внимание в качестве фактора, который контролирует уровень HDL-с в крови (непатентный документ 2). Хорошо известно, что существует отрицательная корреляция между болезнью коронарных артерий (далее обозначаемой как CAD) и уровнем HDL-с в крови. HDL-с демонстрирует антиатерогенный эффект через антиоксидантный эффект, противовоспалительный эффект и обратный транспорт холестерина и т.д., низкий уровень HDL-с в крови считается одним из факторов риска CAD. Таким образом, ингибитор EL может представлять собой лекарственное средство от CAD посредством увеличения уровня HDL-с в крови. В действительности было описано, что у мышей с бляшками, имеющих нокаут EL, увеличивался уровень HDL-с и уменьшались атеросклеротические бляшки (непатентный документ 3).

Эти данные указывают на то, что селективный ингибитор EL является пригодным в качестве лекарственного средства от нарушений метаболизма липидов и артериосклероза.

Селективное ингибирование EL является пригодным в качестве лекарственного средства от нарушений метаболизма липидов и артериосклероза, таким образом, продукция антител против EL, которые ингибируют активность EL, является одним из важных подходов. В настоящее время сообщается, что было получено поликлональное антитело кролика, которое ингибирует активность EL, после введения антитела мыши уровень HDL-с в крови возрастал (непатентный документ 4).

Поликлональные антитела распознают различные области EL и не обладают высокой селективностью в отношении EL. Также является невозможным использование поликлональных антител кролика против EL, обладающих высокой иммуногенностью у человека, в качестве лекарственного средства от хронических заболеваний, поскольку лекарственные средства от хронических заболеваний, таких как нарушение метаболизма липидов и артериосклероз, связанные с EL, необходимо принимать длительно. Более того, трудно манипулировать иммуногенностью поликлональных антител.

Ввиду этих обстоятельств является желательным моноклональное антитело, селективно ингибирующее ферментативную активность EL.

Непатентный документ 1: Nature Genetics, 1999, vol. 21, p. 424.

Непатентный документ 2: TCM., 2004, vol. 14(5), p. 202-206.

Непатентный документ 3: The Journal of Biological Chemistry, 2004, vol. 279, No. 43, 22 p. 45085-45092

Непатентный документ 4: J. Clin. Invest., 2003, vol. 111(3), p. 357.

Сущность изобретения

Проблема, решаемая с помощью изобретения

Задачей настоящего изобретения является предоставление гуманизированного моноклонального антитела, которое селективно ингибирует ферментативную активность EL, или его фрагмента и фармацевтической композиции, содержащей их.

Способы решения проблемы

В результате старательных усилий авторы настоящего изобретения успешно обнаружили гуманизированное моноклональное антитело, которое селективно ингибирует ферментативную активность EL.

Точнее, настоящее изобретение относится к следующему.

(1) Гуманизированное моноклональное антитело, которое ингибирует ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы, или его фрагмент, где они распознают аминокислотные остатки в положениях 1-157 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(2) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (1), где они распознают аминокислотные остатки в положениях 50-100 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(3) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (1) или (2), где они распознают аргинин в положении 50, аспарагин в положении 52, аргинин в положении 54, аспарагиновую кислоту в положении 58, глутаминовую кислоту в положении 60, гистидин в положении 61, глицин

в положении 63, тирозин в положении 65 или аспарагин в положении 100 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(4) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (1) или (2), где они распознают аргинин в положении 50, глутаминовую кислоту в положении 60, гистидин в положении 61, тирозин в положении 65 или аспарагин в положении 100 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(5) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (1) или (2), где они распознают тирозин в положении 65 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(6) Гуманизированное моноклональное антитело, которое ингибирует ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы, или его фрагмент, где они распознают аминокислотные остатки в положениях 202-305 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(7) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (6), где они распознают аминокислотные остатки в положениях 220-273 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(8) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (6) или (7), где они распознают гистидин в положении 220, треонин в положении 221, тирозин в положении 222, треонин в положении 223, аргинин в положении 224, фенилаланин в положении 226, глицин в положении 227, глицин в положении 231, изолейцин в положении 232, глутамин в положении 233, метионин в положении 234, аспарагиновую кислоту в положении 240, тирозин в положении 242, пролин в положении 243, аспарагин в положении 244, глицин в положении 246, глутамин в положении 249, пролин в положении 250, глицин в положении 251, лейцин в положении 254, лейцин в положении 258, тирозин в положении 263, валин в положении 269 или глутаминовую кислоту в положении 273 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(9) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (6) или (7), где они распознают гистидин в положении 220, треонин в положении 221, аспарагиновая кислота в положении 240, тирозин в положении 242, пролин в положении 243, аспарагин в положении 244, глицин в положении 246, глутамин в положении 249, пролин в положении 250 или глицин в положении 251 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(10) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (6) или (7), где они распознают гистидин в положении 220, треонин в положении 221, аспарагиновую кислоту в положении 240, тирозин в положении 242, пролин в положении 243, аспарагин в положении 244, глицин в положении 246, глутамин в положении 249, пролин в положении 250 и глицин в положении 251 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

(11) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно любому из (1)-(10), где они ингибируют ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы с IC_{50} 10 нМ или менее.

(12) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (11), где они ингибируют ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы с IC_{50} 5 нМ или менее.

(13) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (11), где они ингибируют ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы с IC_{50} 2 нМ или менее.

(14) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, выбранные из группы:

1) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, включающую три CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и

вариабельную область легкой цепи, включающую три CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

2) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, включающую три CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и

вариабельную область легкой цепи, включающую три CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, где по меньшей мере в одной из трех CDR одна или несколько аминокислот удалены, заменены или вставлены, и
ингибирующие ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы.

3) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, включающую три CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, где по меньшей мере в одной из трех CDR одна или несколько аминокислот удалены, заменены или вставлены, и

вариабельную область легкой цепи, включающую три CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 71.

32) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 77, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 73.

33) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 77, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 76.

34) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 81, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 71.

35) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 81, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 73.

36) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 81, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 76.

37) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 81, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 80.

38) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 86, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 83.

39) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент, имеющие
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 86, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 84.

(17) Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с сосудисто-эндотелиальной липазой, содержащая гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно любому из (1)-(16).

(18) Фармацевтическая композиция согласно (17), где заболевание, ассоциированное с сосудисто-эндотелиальной липазой, представляет собой дислипидемию.

(19) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно любому из (1)-(16) для лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с сосудисто-эндотелиальной липазой.

(20) Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент согласно (19), где заболевание, ассоциированное с сосудисто-эндотелиальной липазой, представляет собой дислипидемию.

(21) Способ лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с сосудисто-эндотелиальной липазой, характеризующийся введением гуманизированного моноклонального антитела или его фрагмента согласно любому из (1)-(16).

(22) Способ согласно (21), где заболевание, ассоциированное с сосудисто-эндотелиальной липазой, представляет собой дислипидемию.

Эффект изобретения

Поскольку гуманизированное моноклональное антитело по настоящему изобретению обладает активностью в отношении селективного ингибирования ферментативной активности EL, фармацевтические композиции, содержащие гуманизированное моноклональное антитело по настоящему изобретению, являются в высокой степени полезными в качестве лекарственного средства, особенно лекарственного средства для предупреждения и/или лечения дислипидемии, гиперлипидемии, артериосклероза, атеросклероза, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, диабета, ожирения и/или синдрома X.

На фиг. 18B представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h23H8-S2.

На фиг. 18C представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h23h8-S3.

На фиг. 19A представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h13B3-S1.

На фиг. 19B представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h13B3-S2.

На фиг. 19C представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h13B3-S3.

На фиг. 19D представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h13B3-S4.

На фиг. 20A представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h12B10-S1.

На фиг. 20B представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h12B10-S2.

На фиг. 20C представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h12B10-S3.

На фиг. 20D представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h12B10-S4.

На фиг. 21A представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h16F6-S1.

На фиг. 21B представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h16F6-S2.

На фиг. 21C представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h16F6-S3.

На фиг. 21D представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h16F6-S4.

На фиг. 21E представлены аминокислотные последовательности переменных областей антитела h16F6-S5.

Способ осуществления изобретения

Настоящее изобретение относится к гуманизованному моноклональному антителу, характеризующемуся селективным ингибированием ферментативной активности сосудисто-эндотелиальной липазы. Поскольку моноклональное антитело по настоящему изобретению обладает активностью селективного ингибирования ферментативной активности сосудисто-эндотелиальной липазы, оно является в высокой степени полезным в качестве лекарственного средства для предупреждения или лечения артериосклероза или метаболического синдрома.

Является важным использование пептида, имеющего последовательно расположенные аминокислотные остатки, содержащие аминокислотную последовательность в положениях области 1-157 или 202-305 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, в качестве антигена для получения моноклонального антитела по настоящему изобретению. Длина, в частности, не ограничена, однако являются желательными шесть или более остатков, которые обладают иммуногенностью. В качестве конкретных примеров этих антител можно использовать клеточные линии с высокой экспрессией, обеспеченной естественным или искусственным образом, их мембранные фракции, их очищенные продукты, белки, слитые с другими белками или пептидами (например, белковыми метками, такими как FLAG-метка, HIS-метка, GST-метка или C2-метка и т.д. или флуоресцентными белками, такими как GFP или EGFP и т.д.), или химически синтезированные пептиды. Кроме того, способы получения этих иммуногенов известны специалистам в данной области.

Моноклональное антитело по настоящему изобретению можно получать с помощью известного широко используемого способа получения. В частности, млекопитающее, предпочтительно, мышь, крысу, хомячка, морскую свинку, кролика, кошку, собаку, свинью, козу, овцу, осла, лошадь или быка, более предпочтительно мышь, крысу, хомячка, морскую свинку или кролика, иммунизируют иммуногеном по настоящему изобретению, при необходимости вместе с адъювантом Фрейнда, один или несколько раз посредством подкожной, внутримышечной, внутривенной, проводимой в подушечку лапы или внутрибрюшинной инъекции. Обычно иммунизацию проводят от одного до четырех раз каждые от 1 до 21 суток после первичной иммунизации, и антителопродуцирующие клетки можно получать из иммунизированного животного приблизительно через 1-10 суток после последней иммунизации. Количество раз и временной интервал между иммунизациями можно изменять соответствующим образом в зависимости от свойств используемого иммуногена.

Гибридому, которая секретирует моноклональное антитело, можно получать способом Kohler и Milstein (Nature, 1975, vol. 256, p. 495-497) и сходным способом. Иными словами, гибридому можно получать путем клеточного слияния между антителопродуцирующей клеткой, содержащейся в селезенке,

лимфатическом узле, костном мозге, миндалевидной железе и т.п., предпочтительно в селезенке, извлеченной из млекопитающего, иммунизированного, как описано выше, и миеломной клеткой, лишенной способности продуцировать аутоантитела, предпочтительно полученной из млекопитающего, такого как мышь, крыса, морская свинка, хомячок, кролик или человек, более предпочтительно из мыши, крысы или человека.

Поскольку для слияния клеток используют клетки миеломы, как правило, можно использовать клеточные линии, происходящие из мыши, например, P3-U1, NS-1, SP-2, 653, X63, AP-1 и т.п.

Гибридомы, которая продуцирует моноклональное антитело, подвергают скринингу путем культивирования гибридомы, например, в микропланшете для титрования, измерения реактивности в отношении иммуногена, использованного в иммунизации мыши, как описано выше, в культуральном супернатанте в лунке, в которой наблюдают пролиферацию, с помощью способа измерения, такого как RIA, ELISA или FACS, и селекции клона, который продуцирует моноклональное антитело, демонстрирующее специфическую аффинность в отношении иммуногена или гаптена. При измерении указанной реактивности иммуноген обычно нанесен на твердую фазу, и антитело в культуральном супернатанте, которое связывается с иммуногеном, нанесенным на твердую фазу, обнаруживают с помощью вторичного антитела против антител мыши, меченого радиоактивным веществом, флуоресцентным веществом или ферментом. Кроме того, в случае использования клеток, экспрессирующих иммуноген, культуральный супернатант гибридомы добавляют к клеткам, а затем после реакции со вторичным антителом, меченым флуоресцентной меткой, можно обнаруживать моноклональное антитело по настоящему изобретению, которое связывается с иммуногеном на клеточной мембране, путем измерения интенсивности флуоресценции клеток с помощью устройства для обнаружения флуоресценции, такого как устройство для точной цитометрии и т.п.

Продукцию моноклонального антитела выбранной гибридомой можно обеспечивать путем культивирования гибридомы *in vitro* или в асцитной жидкости мыши, крысы, морской свинки, хомячка или кролика, предпочтительно мыши или крысы или более предпочтительно мыши, за которым следует выделение из полученного культурального супернатанта или асцитной жидкости животного. В случае культуры *in vitro* гибридомы можно культивировать в известной питательной среде или в любых питательных культурах, происходящих и полученных из известной основной среды, используемой для пролиферации, поддержания и хранения гибридомы и для продукции моноклонального антитела в культуральном супернатанте, в зависимости от различных условий, таких как свойство культивируемых типов клеток, объект исследования и способ культивирования.

В качестве основной среды может быть упомянута, например, среда с низким содержанием кальция, такая как среда Хэма F12, среда MCDB153 или культуральная среда MEM с низким содержанием кальция, и среда с высоким содержанием кальция, такая как среда MCDB104, среда MEM, среда D-MEM, среда RPMI1640, среда AF104 или среда RD, и такая основная среда может содержать, например, сыворотку, гормон, цитокин и/или различные неорганические или органические вещества, в зависимости от задачи.

Выделение и очистку моноклонального антитела можно осуществлять, подвергая культуральный супернатант и асцитную жидкость, как описано выше, воздействию насыщенного сульфата аммония, ионообменной хроматографии (например, DEAE или DE52), аффинной хроматографии на колонке, такой как антииммуноглобулиновая колонка или колонка с белком А и т.п.

В качестве моноклонального антитела по настоящему изобретению, можно использовать рекомбинантное антитело, продуцированное с использованием технологии рекомбинации генов, при которой ген антитела клонируют из антителопродуцирующей клетки, например гибридомы, и встраивают в соответствующий вектор, и вектор вводят хозяину (например, Carl et al., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, опубликованная в 1990 году).

В частности, из гибридомы, которая продуцирует требуемое антитело, или из иммунной клетки, которая продуцирует антитело, например, из клетки, полученной посредством иммортализации сенсibilизированного лимфоцита и т.п. с помощью гена злокачественной опухоли и т.д, выделяют мРНК, кодирующую переменную область (V-область) антитела. При выделении мРНК получают тотальную РНК известным способом, например, ультрацентрифугированием с гуанидином (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) и т.п., и мРНК получают с использованием набора для очистки мРНК (доступного от Pharmacia) и т.п.

На основе полученной мРНК синтезируют кДНК V-области антитела с использованием обратной транскриптазы. Синтез кДНК можно проводить с использованием набора для синтеза первой цепи кДНК с обратной транскриптазой AMV и т.п. Кроме того, для синтеза и амплификации кДНК, можно использовать набор 5'-Ampli FINDER RACE Kit (доступный от Clontech) и способ 5'-RACE с использованием ПЦР (Frohman, M.A. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, vol. 85, p. 8998). Требуемый фрагмент ДНК очищают от полученного продукта ПЦР и связывают с векторной ДНК. Таким образом, получают рекомбинантный вектор и вводят его в *E.coli* и т.п. и колонии подвергают селекции и получают желаемый рекомбинантный вектор. Последовательность оснований требуемой ДНК подтверждают известным способом, например дезокси-способом.

Когда получают ДНК, кодирующую V-область требуемого антитела, ДНК связывают с ДНК, кодирующей желаемую константную область антитела (С-область), и встраивают в экспрессирующий вектор. Альтернативно ДНК, кодирующую V-область антитела, можно встраивать в экспрессирующий вектор, содержащий ДНК С-области антитела. Для получения антитела, используемого в рамках настоящего изобретения, ген антитела встраивают в экспрессирующий вектор таким образом, чтобы он экспрессировался под контролем области контроля экспрессии, например, энхансера/промотора. Далее, этим экспрессирующим вектором можно трансформировать клетку-хозяина, обеспечивая экспрессию антитела.

Для экспрессии гена антитела тяжелую цепь (H-цепь) и легкую цепь (L-цепь) антитела можно по отдельности встраивать в экспрессирующие векторы и хозяина можно совместно трансформировать этими экспрессирующими векторами, или ДНК, кодирующую H-цепь и L-цепь, можно включать в единственный экспрессирующий вектор для трансформации хозяина полученным экспрессирующим вектором (см. WO 94/11523).

Также для так называемой технологии фагового дисплея можно использовать способ получения моноклонального антитела по настоящему изобретению, отличный от описанного выше способа. В частности, например, библиотеку генов антител, полученную в качестве материала В-лимфоцитов человека или животного (например, кролика, мыши, крысы, хомячка и т.п.) известным способом, или полностью синтезированной библиотеку генов антител, полученную из подвергнутой селекции и модифицированной последовательности эмбрионального типа человека или животного, презентируют на клеточной поверхности, на рибосоме и т.п. бактериофага, *Escherichia coli*, дрожжей, клеток животных и т.п. В этом случае антитела, подлежащие презентированию на клеточной поверхности, имеют форму молекулы IgG, молекулы IgM, Fab-фрагменты, одноцепочечные Fv(scFv)-фрагменты и т.д.

Гены антител можно получать путем встраивания полученного таким образом фрагмента моноклонального антитела в соответствующую область гена IgG-антитела известным способом. Путем включения полученных таким образом генов в подходящий вектор и введения вектора хозяину можно получать антитело способами рекомбинантных ДНК (например, см. Carl et al. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, издание 1990).

Моноклональное антитело по настоящему изобретению характеризуется тем, что оно является селективным в отношении ингибирования ферментативной активности сосудисто-эндотелиальной липазы. Ниже представлен пример методики измерения способности ингибирования ферментативной активности EL.

ДНК, кодирующую EL, клонируют в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Invitrogen). Экспрессирующий вектор трансфицируют в клетки HEK293F и их культивируют при 37°C, 8% CO₂, в течение 2 суток. Клеточные культуры центрифугируют, клетки собирают и ресуспендируют в PBS, содержащем 20 Ед./мл гепарина. Суспензию клеток инкубируют при 37°C в течение 45 мин. Супернатант, полученный посредством удаления клеток центрифугированием, используют в качестве раствора фермента EL человека для измерения ингибиторной активности.

После добавления моноклонального антитела к раствору, содержащему 20 mM буфер Tris-HCl (pH 7,5), 0,5% бычий сывороточный альбумин, 4 mM CaCl₂, 150 mM NaCl и 2 мг/мл HDL человека (Athens Research & Technology), добавляют раствор фермента EL. После реакции при 37°C в течение 2 ч определяют свободную жирную кислоту (NEFA), образовавшуюся из HDL под действием фермента EL, с использованием NEFA C-test Wako (Wakojuunyakukougyo), количество NEFA используют в качестве показателя ферментативной активности. Ферментативную активность без добавления антитела определяют в качестве контрольной величины, и специфическую активность вычисляют против контрольной величины при каждой концентрации антитела. Концентрацию, при которой ингибируется 50% антитела, можно вычислять на основе кривой ингибирования.

Часто в качестве показателя активности ингибирования EL используют эффективную концентрацию (IC₅₀) антитела, которая демонстрирует 50% ингибирование ферментативной активности EL.

В рамках настоящего изобретения моноклональное антитело или его фрагмент, ингибирующие ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы с IC₅₀ 10 нМ или менее, означают моноклональное антитело или его фрагмент, демонстрирующие IC₅₀ 10 нМ или менее при измерении согласно способу, описанному выше. Для измерения можно использовать EL любого вида, если EL происходит из млекопитающего. Если моноклональное антитело или его фрагмент ингибирует ферментативную активность EL любого вида млекопитающих с IC₅₀ 10 нМ или менее, моноклональное антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, демонстрирующие IC₅₀ 10 нМ или менее.

Далее, моноклональное антитело по настоящему изобретению характеризуется тем, что оно является селективным в отношении ингибирования ферментативной активности EL. Ниже продемонстрирован пример методики подтверждения для измерения способности селективно ингибировать ферментативную активность EL, иными словами, отсутствия ингибирования ферментативной активности LPL или HL.

ДНК, кодирующую HL, клонируют в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Invitrogen). Экспрессирующий вектор переносят в клетки HEK293F и культивируют при 37°C, 8% CO₂, в течение 2 суток. Клеточные культуры центрифугируют, клетки собирают, и клетки ресуспендируют в PBS, содержащем

20 Ед./мл гепарина. Суспензию клеток инкубируют при 37°C в течение 45 мин.

Супернатант, полученный удалением клеток посредством центрифугирования, используют в качестве раствора фермента HL человека. Раствор фермента LPL получают с использованием тех же методик. После добавления моноклонального антитела в раствор, содержащий 20 мМ буфер Tris-HCl (pH 7,5), 0,5% бычий сывороточный альбумин, 4 мМ CsCl₂, 150 мМ NaCl и 0,5 мг/мл VLDL человека (INTRACEL), добавляют раствор фермента HL или LPL. После реакции при 37°C в течение 2 ч определяют уровень свободной кислоты (NEFA), образованной из VLDL ферментом HL или LPL, с использованием NEFA C-test Wako (Wakojuunyakukougyo), количество NFFA используют в качестве показателя ферментативной активности. Ферментативную активность без добавления антитела определяют в качестве контрольной величины и специфическую активность вычисляют против контрольной величины при каждой концентрации антитела.

Наличие селективности в отношении ингибирования ферментативной активности EL означает ингибирование ферментативной активности LPL или HL, составляющее не более 3%, когда моноклональное антитело добавляют в концентрации, равной IC₅₀ против EL. Область эпитопа моноклонального антитела по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой область EL, которая не обладает гомологией с LPL или HL, поскольку моноклональное антитело по настоящему изобретению характеризуется отсутствием ингибирования ферментативной активности LPL и HL и характеризуется селективностью ингибирования ферментативной активности EL.

Гуманизованное моноклональное антитело по настоящему изобретению представляет собой гуманизованную версию моноклонального антитела, имеющую описанный выше признак. Гуманизованное моноклональное антитело получают путем пересадки определяющей комплементарности области (CDR) антитела млекопитающего, отличного от человека, например мыши, вместо CDR антитела человека. Таким образом, каркасная область происходит из антитела человека. Подходящая каркасная область может быть выбрана в соответствии с документами Kabat E. A. et al. FR может быть выбрана таким образом, чтобы CDR могли формировать соответствующий антигенсвязывающий центр. Если необходимо, аминокислоты в варибельной области FR можно заменять таким образом, чтобы CDR реконструированного гуманизованного антитела могли формировать соответствующий антигенсвязывающий центр (Sato, K. et al., Cancer Res. 1993, vol. 53. p. 851).

Доля замещенных аминокислот в FR составляет от 0 до 15% всей области FR, предпочтительно от 0 до 5% всей области FR.

Общий способ получения гуманизованного моноклонального антитела также известен (например, WO 95/14041 и WO 96/02576 и т.д.). В частности, последовательность ДНК, кодирующую варибельную область, сконструированную для связывания CDR антитела мыши с FR антитела человека, синтезируют способом ПЦР из нескольких олигонуклеотидов, полученных таким образом, чтобы они имели перекрывающиеся части на их концах (см. WO 98/13388). Полученную ДНК связывают с ДНК, кодирующей константную область антитела человека, и полученную ДНК встраивают в экспрессирующий вектор. Альтернативно, ДНК, кодирующую варибельную область антитела, можно включать в экспрессирующий вектор, содержащий ДНК, кодирующую константную область антитела. Для получения антитела по настоящему изобретению ген антитела можно встраивать в экспрессирующий вектор для экспрессии под контролем области контроля экспрессии, например, энхансера/промотора. Кроме того, этим экспрессирующим вектором трансформируют клетки-хозяева и, таким образом, они могут продуцировать антитело. В качестве клетки-хозяина могут быть упомянуты клетки позвоночных, такие как клетки COS или клетки CHO, прокариотические клетки или клетки дрожжей.

Для экспрессии гена антител гены тяжелой цепи (H-цепь) и легкой цепи (L-цепь) антитела можно по отдельности встраивать в экспрессирующие векторы и хозяина можно трансформировать одновременно этими экспрессирующими векторами или ДНК, кодирующую H-цепь и L-цепь, можно включать в единый экспрессирующий вектор для трансформации полученным экспрессирующим вектором хозяина (см. WO 94/11523).

Желаемые трансформанты, полученные описанными ранее способами, можно культивировать способами, известными специалисту в данной области. Посредством этого культивирования в трансформантах и наружу клеток продуцируется гуманизованное моноклональное антитело против PcgV. Среду для культивирования можно выбирать из общепринятых сред соответствующим образом в зависимости от клетки-хозяина. В случае описанных выше клеток COS является доступной среда, такая как RPMI-1640, модифицированная способом Дульбекко минимально обогащенная среда Игла (DMEM), и, если необходимо, можно добавлять сывороточные ингредиенты, такие как эмбриональная телячья сыворотка (FBS). Температура культивирования трансформантов не ограничена при условии, что не происходит значительного снижения продукции белка в клетке. Предпочтительно используют температуры от 32 до 42°C. Наиболее предпочтительно используют температуру 37°C. При необходимости культивирование можно проводить в атмосфере, содержащей диоксид углерода в количестве от 1 до 10% (об./об.).

Фракции, содержащие гуманизованное антитело против PcgV по настоящему изобретению, продуцированное в трансформантах или наружу клеток способами, описанными выше, можно очищать известными способами разделения. Эти способы основаны на физическом свойстве или химическом свой-

стве белка-мишени. В частности, например, является доступной обработка средством для преципитации белков, хроматография, такая как ультрафильтрационная хроматография, хроматография сепарации по размеру, адсорбционная фильтрационная хроматография, ионообменная хроматография, аффинная хроматография или высокоэффективная жидкостная хроматография, диализ и их комбинация.

Согласно ранее описанным способам желаемое гуманизованное моноклональное антитело против EL можно получать с высоким выходом и хорошего качества. Аминокислотные последовательности переменных областей оптимизированных антител представлены на фиг. 15-21. Эти антитела конструировали путем пересадки аминокислот целых последовательностей CDR и частичных последовательностей FR, которые выбраны для гуманизации моноклонального антитела мыши (16B3, 55A1, 53A11, 23H8, 13B3, 12B10 или 16F6), в антитело человека.

По сравнению с антителом мыши (16B3, 55A1, 53A11, 23H8, 13B3, 12B10 или 16F6), продуцированным клетками гибридомы, эти гуманизованные антитела имели эквивалентную ферментативную активность ингибирования EL. Хотя гуманизация антител с сохранением активности исходного антитела обычно является трудной, авторы настоящего изобретения успешно получили гуманизованное антитело, обладающее активностью, эквивалентной активности исходного антитела мыши. Гуманизованное антитело является пригодным для лечения вследствие его более низкой антигенности в организме человека.

В качестве константной области гуманизованного антитела по настоящему изобретению является доступной константная область антитела человека. В качестве предпочтительной константной области антитела человека может быть упомянута C γ для тяжелой цепи, и, например, можно использовать C γ 1, C γ 2, C γ 3 и C γ 4, и могут быть упомянуты C κ или C λ для легкой цепи. Кроме того, C-область антитела человека можно модифицировать для повышения стабильности антитела или его эффективности. При гуманизации доступное антитело человека может представлять собой антитело любого изотипа, такого как IgG, IgM, IgA, IgE и IgD. В рамках настоящего изобретения предпочтительным является IgG и более предпочтительными являются IgG1 или IgG4.

Гуманизованное моноклональное антитело по настоящему изобретению может представлять собой конъюгированное антитело, которое можно получать путем конъюгации с некоторой молекулой, такой как полиэтиленгликоль (PEG), радиоактивное вещество или токсин. Эти конъюгированные моноклональные антитела получают путем химической модификации антитела. Способы модификации антитела являются общеизвестными в данной области техники. Гуманизованное моноклональное антитело по настоящему изобретению охватывает эти конъюгированные моноклональные антитела.

Гуманизованное моноклональное антитело по настоящему изобретению можно подвергать слиянию с другими белками на его N-конце или C-конце (Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281). Специалист в данной области может выбрать белки для слияния соответствующим образом.

В рамках настоящего изобретения "фрагмент моноклонального антитела" означает часть вышеупомянутого моноклонального антитела по настоящему изобретению, и он обладает способностью к специфическому связыванию с сосудисто-эндотелиальной липазой, как и моноклональное антитело, или означает фрагмент, который обладает способностью к специфическому связыванию с сосудисто-эндотелиальной липазой, как и моноклональное антитело, и обладает эффектом ингибирования ферментативной активности сосудисто-эндотелиальной липазы, как и моноклональное антитело.

В частности, фрагменты, которые обладают способностью к специфическому связыванию EL, представляют собой Fab, F(ab')₂, Fab', одноцепочечное антитело (scFv), стабилизированное дисульфидной связью антитело (dsFv), димеризованный фрагмент V-области (диантитело), пептид, содержащий CDR, и т.д. (Expert opinion on therapeutic patents, vol. 6, No. 5, p. 441-456, 1996).

Fab представляет собой фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу приблизительно 50000, обладающий активностью связывания антигена, состоящий приблизительно из половины N-концевой части H-цепи и целой L-цепи, полученный путем расщепления ферментом папаином пептидной части выше двух дисульфидных связей (связь S-S), сшивающих две H-цепи в шарнирной области IgG. Fab, используемый в рамках настоящего изобретения, можно получать путем обработки моноклонального антитела по настоящему изобретению папаином. Альтернативно Fab можно получать путем встраивания ДНК, кодирующей Fab моноклонального антитела по настоящему изобретению, в экспрессирующий вектор для клетки и введения вектора в клетку для обеспечения экспрессии.

F(ab')₂ представляет собой фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу приблизительно 100000, обладающий активностью связывания антигена, образованный связыванием двух Fab'-областей в шарнирной части. Эти области Fab' получают деградацией пепсина ниже двух связей S-S шарнирной области IgG. F(ab')₂, используемый в рамках настоящего изобретения, можно получать путем обработки моноклонального антитела по настоящему изобретению пепсином. Альтернативно, F(ab')₂ можно получать путем встраивания ДНК, кодирующей F(ab')₂ моноклонального антитела, в экспрессирующий вектор для клетки и введения вектора в клетку E.coli, клетку дрожжей или клетку животных для обеспечения экспрессии.

Fab' представляет собой фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу приблизительно 50000, обладающий активностью связывания антитела, получаемый расщеплением S-S-связи между шарнирными областями вышеупомянутого F(ab')₂. Fab', используемый в рамках настоящего изобретения, можно получать путем обработки F(ab')₂ моноклонального антитела по настоящему изобретению восстановителем дитиотреитолом. Альтернативно Fab' можно получать путем встраивания ДНК, кодирующей Fab' моноклонального антитела, в экспрессирующий вектор для клетки и введения вектора в клетку *E.coli*, клетку дрожжей или клетку животных для обеспечения экспрессии.

scFv представляет собой пептид VH-P-VL или VL-P-VH, в котором одна цепь VH и одна цепь VL связаны с использованием подходящего пептидного линкера (далее обозначаемого как P), и представляет собой фрагмента антитела, обладающий активностью связывания антигена. VH и VL, содержащиеся в scFv, используемые в рамках настоящего изобретения, могут происходить из моноклонального антитела по настоящему изобретению. scFv, используемый в рамках настоящего изобретения, можно получать путем получения кДНК, кодирующей VH и VL, из гибридомы, продуцирующей моноклональное антитело по настоящему изобретению, конструирования экспрессирующего вектора scFv и обеспечения экспрессии путем введения экспрессирующего вектора в клетку *E.coli*, клетку дрожжей или клетку животных.

dsFv относится к фрагменту, получаемому посредством связывания полипептидов, в каждом из которых один из аминокислотных остатков заменен остатком цистеина в VH и VL, через связь S-S. Аминокислота, подлежащая замене на остаток цистеина, может быть выбрана, исходя из прогнозирования третичной структуры антитела способом, описанным Reiter et al. (*Protein Engineering*, 7, 697 (1994)). VH или VL, содержащиеся в dsFv, используемом в рамках настоящего изобретения, могут происходить из моноклонального антитела по настоящему изобретению. dsFv, используемый в рамках настоящего изобретения, можно получать путем получения кДНК, кодирующей VH и VL, из гибридомы, продуцирующей моноклональное антитело по настоящему изобретению, конструирования экспрессирующего вектора dsFv путем встраивания в соответствующий экспрессирующий вектор, и обеспечения экспрессии путем введения экспрессирующего вектора в клетки *E.coli*, клетки дрожжей или клетки животных.

Диантитело представляет собой фрагмент антитела, когда образуется димер scFv, имеющих одинаковую или различающуюся специфичность связывания антигена, и оно представляет собой фрагмент антитела, обладающий двухвалентной антигенсвязывающей активностью в отношении одного антигена или двумя антигенсвязывающими активностями, специфичными к различным антигенам. Например, двухвалентное диантитело, которое специфически реагирует с моноклональным антителом по настоящему изобретению, можно получать путем получения кДНК, кодирующей VH и VL моноклонального антитела по настоящему изобретению, конструирования ДНК, кодирующей scFv, имеющий пептидный линкер из 3-10 остатков, встраивания ДНК в экспрессирующий вектор для клетки и обеспечения экспрессии диантитела путем введения полученного экспрессирующего вектора в клетку *E.coli*, клетку дрожжей или клетку животных.

Пептид, содержащий CDR, включает по меньшей мере одну область CDR VH или VL. Множество CDR можно комбинировать прямо или через соответствующий пептидный линкер. Пептид, содержащий CDR, используемую в рамках настоящего изобретения, можно получать путем получения кДНК, кодирующей VH и VL моноклонального антитела по настоящему изобретению, конструирования ДНК, кодирующей CDR, встраивания ДНК в экспрессирующий вектор для клетки животного и обеспечения экспрессии путем введения полученного экспрессирующего вектора в клетку *E.coli*, клетку дрожжей или клетку животных. Пептид, содержащий CDR, также можно получать способом химического синтеза, таким как способ Fmoc (способ с флуоренилметилоксикарбонилем) или способ tBoc (способ с третбутилоксикарбонилем).

Моноклональное антитело или его часть по настоящему изобретению можно модифицировать при условии, что они являются пригодными для применения в рамках настоящего изобретения. В качестве модифицированной структуры можно использовать антитела, связанные с различными молекулами, в том числе с полиэтиленгликолем (ПЭГ) и т.п. Модификация, внесенная в антитело, может представлять собой модификацию путем внесения химической связи, или она может представлять собой модификацию аминокислотной последовательности антитела. Моноклональное антитело или его часть по настоящему изобретению также охватывают эти модифицированные структуры антител. Для получения таких модифицированных структур антител полученное антитело можно модифицировать. Эти способы являются общеизвестными в данной области.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи гуманизованного моноклонального антитела по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также охватывает полинуклеотид, который может гибридизоваться с указанным полинуклеотидом в жестких условиях и кодирует антитело, обладающее активностью, эквивалентной активности антитела по настоящему изобретению.

Полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой полимер, состоящий из нуклеотида, такого как различные дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) или рибонуклеиновые кислоты (РНК), при условии, что он кодирует антитело по настоящему изобретению. Они могут включать осно-

вания, отличные от природных продуктов. Полинуклеотид по изобретению может облегчать продукцию антител способами генетической технологии.

Полинуклеотид по изобретению также может быть пригодным в качестве зонда для скрининга антител, обладающих активностью, эквивалентной активности антитела по настоящему изобретению. Таким образом, с использованием в качестве зонда полинуклеотида, кодирующего антитело по настоящему изобретению или его часть, с помощью способа, такого как способ гибридизации или способ амплификации генов, например ПЦР, можно получать ДНК, которая может гибридизоваться с указанным полинуклеотидом в жестких условиях и кодирует антитело, обладающее активностью, эквивалентной активности антитела по настоящему изобретению. Такие ДНК также охватываются полинуклеотидом по настоящему изобретению.

Способ гибридизации (Sambrook, J et al., *Molecular Cloning* 2nd ed., 9,47-9,58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) хорошо известен специалисту в данной области. Условия гибридизации, например, представляют собой условия гибридизации низкой жесткости. Условия низкой жесткости означают стадию промывания после проведения гибридизации, например, в $0,1 \times \text{SSC}$, содержащем 0,1% SDS при 42°C, предпочтительно в $0,1 \times \text{SSC}$, содержащем 0,1% SDS, при 50°C. Более предпочтительными условиями гибридизации являются условия гибридизации высокой жесткости. Условия гибридизации высокой жесткости означают, например, $5 \times \text{SSC}$, содержащий 0,1% SDS, при 65°C. Ожидается, что в этих условиях при более высокой температуре можно эффективно получить полинуклеотид с более высоким сходством. В качестве фактора, влияющего на жесткость гибридизации, можно упомянуть несколько факторов, таких как температура или концентрация соли. Специалист в данной области может подбирать эти факторы соответствующим образом и может достигать сходной жесткости.

Антитела, функционально эквивалентные антителу по настоящему изобретению, обычно обладают высоким сходством аминокислотной последовательности. Эти антитела кодируются полинуклеотидом, который получают описанными выше способами гибридизации или амплификации генов. Антитела, которые являются функционально эквивалентными антителу по настоящему изобретению и обладают высоким сходством аминокислотной последовательности, охватываются настоящим изобретением. Высокое сходство означает сходство аминокислотных последовательностей по меньшей мере более чем на 50%, предпочтительно на 75% и более предпочтительно на 85 и 95%. Для определения сходства полипептидов является доступным алгоритм, описанный в документе (Wilbur, W.J. и Lipman, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 80, 726-730).

Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению характеризуется распознаванием аминокислотных остатков в положениях 1-157 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или распознаванием аминокислотных остатков в положениях 202-305 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Распознавание аминокислотных остатков в положениях 1-157 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 означает, что моноклональное антитело распознает аминокислотный остаток или аминокислотные остатки в этой области.

Гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению являются пригодными в качестве фармацевтической композиции. Таким образом, фармацевтическую композицию, содержащую гуманизированное моноклональное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, можно вводить системно или местным путем перорально или парентерально. Для парентерального введения, например, может быть выбрана внутривенная инъекция, такая как капельное вливание, внутримышечная инъекция, внутривенная инъекция, подкожная инъекция, интраназальное введение, ингаляция и т.п.

Также гуманизированное моноклональное антитело по настоящему изобретению является применимым для диагностики дислипидемии, гиперлипидемии, атеросклероза, атеросклероза, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, диабета, ожирения и/или синдрома X, поскольку гуманизированное моноклональное антитело по изобретению обладает способностью к специфическому связыванию сосудисто-эндотелиальной липазы.

Пациент, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, предположительно имеет атеросклероз и метаболический синдром. Эффективную дозу выбирают из диапазона от 0,01 до 100 мг на 1 кг массы тела за один раз. Альтернативно, может быть выбрана доза от 5 до 5000 мг, предпочтительно доза от 10 до 500 мг на пациента. Однако доза фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, не ограничивается этими дозами. Длительность введения также можно выбирать соответствующим образом в зависимости от возраста, симптома пациента и т.п. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может включать фармацевтически приемлемый носитель или добавку в зависимости от пути введения. Примеры такого носителя и добавки включают воду, фармацевтически приемлемый органический растворитель, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, альгинат натрия, растворимый в воде декстран, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, казеин, диглицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, вазелин, сывороточный альбумин человека (HSA), маннит, сорбит, лактозу и поверхностно-активные вещества, допустимые в качестве фармацевтической добавки. Добавку для применения соот-

ветствующим образом выбирают или комбинируют из описанных выше добавок в зависимости от дозированной формы, однако она не ограничивается ими.

Справочный пример 1.

Получение рекомбинантного аденовируса для экспрессии EL павиана кДНК EL павиана с C2-меткой клонировали в вектор pShuttle (Clontech). Этот субклонированный вектор и вектор, содержащий ген остова аденовируса, расщепляли ферментом PI-SceI и I-CeuI (набор Adeno-x Accessory Kit, Clontech). Реакцию лигирования расщепленных фрагментов проводили при 16°C в течение 3 ч (Ligation high, TOYOBO) и продуктами лигирования трансформировали E.coli (OneShot stbl3 Chemically Competent, Invitrogen). После селекции с ампициллином плазмидную ДНК очищали из полученного клонна (набор QIAprep spin Miniprep Kit, QIAGEN) и расщепляли ферментом PacI расщепления области роста E.coli (New England Biolabs). С учетом вышесказанного получали плазмидную ДНК для получения аденовирусного вектора. Полученной плазмидной ДНК трансфицировали клетки HEK293 (American Type Culture Collection) с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen) и культивировали их в DMEM, содержащей 10% FBS при 37°C. После трансфекции культуральную среду заменяли каждые 5 суток и клетки продолжали культивировать до подтверждения цитопатического эффекта (CPE). После подтверждения CPE клетки и культуральный супернатант собирали. Клетки подвергали пяти раундам замораживания/размораживания на сухой бане лед-метанол и теплой бане, после чего супернатант, который был получен центрифугированием в течение 15 мин, собирали в качестве клеточных экстрактов. Культуральный супернатант смешивали с культуральной средой и использовали в качестве первичной культуры вируса. Амплификацию исходной культуры вируса осуществляли путем добавления исходной культуры вируса к клеткам HEK293 и повторения тех же действий. После амплификации исходной культуры вируса полученные в итоге клеточные экстракты обрабатывали бензоназой (Merck-Novagen) в течение 30 мин при 37°C, а затем супернатант использовали для очистки вирусного вектора следующим способом центрифугирования в градиенте плотности. PBS, содержащий 1,5, 1,35, 1,25 г/см³ хлорида цезия, наслаивали в центрифужную пробирку, а затем сверху наслаивали супернатант. Центрифугирование проводили при 35000 об/мин в течение 1 ч при 16°C и полученный вирусный вектор собирали под визуальным контролем. Собранный вирусный вектор подвергали диализу против PBS, содержащего 10% глицерин, а затем использовали в качестве очищенных аденовирусных векторов. Часть вирусного вектора использовали для титрования (набор Adeno-X rapid titer kit, Clontech) и определения возникновения пролиферативного потенциала и для иммунизации использовали только вирусный вектор без аномалий.

Справочный пример 2.

Иммунизация аденовирусным вектором, экспрессирующим EL павиана.

Самок мышей в возрасте 6 недель (вид A/J Jms Slc, полученные от Ninon SLC) иммунизировали внутривенно, подкожно или внутримышечно посредством 2×10^9 к.о.е. аденовирусного вектора, содержащего ген EL павиана. Каждые 7 суток после введения проводили взятие образца крови из хвостовой вены и измеряли титр антител. Далее, проводили дополнительное внутривенное введение аденовирусного вектора, содержащего ген EL павиана, подкожно или внутримышечно. Мышам, которые продемонстрировали высокий титр, проводили вспомогательную иммунизацию через хвостовую вену в качестве конечного введения.

Справочный пример 3.

Получение гибридомы, продуцирующей антитела.

Через 3 суток после конечной иммунизации брюшную полость мышей, которые продемонстрировали высокий титр, открывали и селезенку извлекали. Клетки селезенки и клетки миеломы мыши (р3×63-Ag8.U1, Токуо tumor laboratories) подвергали слиянию с использованием 50% полиэтиленгликоля 4000 и клетки гибридомы отбирали в культуральную среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин.

Справочный пример 4.

Скрининг клеток гибридомы, продуцирующих антитела против EL павиана.

Через 10 суток после слияния клеток отбирали клетки гибридомы, которые продуцировали антитела против EL павиана. На каждую лунку 384-луночных микропланшетов для титрования (Nunc) иммобилизовывали 35 мкл буфера Tris/HCl (50 мМ Tris/HCl, pH 7,5), содержащего 0,35 мкг антитела против IgG-Fc мыши (Jackson Immuno Research). Планшеты инкубировали при 4°C в течение 16 ч. После промывания лунок один раз 90 мкл раствора для промывания (физиологический раствор, содержащий 0,01% Tween20) в лунки добавляли 100 мкл Block-Ace (Dainihonsumitomo) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч (планшет с иммобилизованным антителом против IgG-Fc мыши). После промывания лунок три раза 90 мкл буфера для промывания в лунки добавляли 15 мкл буфера для анализа, содержащего экстракт EL павиана с гепарином (50 мМ Tris/HCl, pH 7,4, содержащий 4% Block-Ace, 0,05% Tween20, 150 мМ NaCl), и инкубировали при комнатной температуре при 4°C в течение 16 ч. После промывания лунок три раза 90 мкл буфера для промывания в лунки добавляли 15 мкл буфера для анализа, содержащего меченное биотином антитело против C2-метки и меченный HRP стрептавидин (Thermo scientific), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания лунок три раза

90 мкл буфера для промывания добавляли 15 мкл ТМВ+-субстрат-хромогена (ДАКО) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл 0,05 М H_2SO_4 , а затем измеряли поглощение при 450 нм. В результате скрининга отбирали 11 гибридом (55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 13B3, 23H8, 16B3, 16E7, 14E1 и 19E7), которые продуцировали антитело против EL павиана. Антитела, которые продуцировались гибридомами 55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 13B3, 23H8, 16B3, 16E7, 14E1 и 19E7, были названы соответственно антителами 55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 13B3, 23H8, 16B3, 16E7, 14E1 и 19E7. Подклассы IgG определяли использованием набора Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit (BD Biosciences).

Подкласс 55A1, 2D5, 53A11, 13B3, 23H8, 16B3 и 19E7 представлял собой IgG2a. Подкласс 7D4, 14A1, 16E7 и 14E1 представлял собой IgG1.

Справочный пример 5.

Измерение ингибиторной активности антител против EL в отношении EL.

Ингибиторную активность антител против EL (55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 13B3, 23H8, 16B3, 16E7, 14E1 и 19E7) в отношении EL павиана, EL яванского макака, химерной EL человека(1-157)-мышь, химерной EL человека(1-53)-мышь, химерной EL человека(61-111)-мышь, EL кролика, EL мышь, химерной EL человека(1-305)-мышь и химерной EL человека(202-500)-мышь измеряли следующим образом. Раствор антител против EL, буфер для анализа (20 мМ Tris/HCl (pH 7,5), 0,5% BSA, 4 мМ $CaCl_2$, 150 мМ NaCl) и 2 мг/мл HDL человека (Athens Research & Technology) смешивали в микропланшете для титрования, а затем добавляли экстракт EL с гепарином. После инкубации при 37°C в течение 90 мин проводили определение высвобождения неэтерифицированной жирной кислоты (NEFA) из HDL с использованием коммерчески доступного набора (NEFA C test-Wako, Wako). Количество NEFA использовали в качестве показателя ферментативной активности. Ферментативную активность без добавления антитела против EL определяли в качестве контрольной величины и специфическую активность вычисляли против контрольной величины при каждой концентрации антитела против EL (фиг. 1A-1K). Концентрацию антитела против EL, при которой ингибировалось 50% активности EL, вычисляли из кривой ингибирования в качестве величины IC_{50} .

Справочный пример 6

Измерение ингибиторной активности антитела против EL в отношении HL и LPL

ДНК, кодирующую HL человека, клонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Invitrogen). Экспрессирующий вектор трансфицировали в клетки НЕК293F и культивировали при 37°C, 8% CO_2 , в течение 2 суток. Клетки центрифугировали и собирали, клетки ресуспендировали PBS, содержащим 20 д.Е/мл гепарина (SIGMA). Суспензию клеток инкубировали при 37°C в течение 45 мин. Супернатант, полученный удалением клеток посредством центрифугирования, использовали в качестве раствора фермента HL человека. Раствор фермента LPL человека получали с использованием того же способа. После добавления антитела против EL в раствор, содержащий буфер 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,5% бычий сывороточный альбумин, 4 мМ $CaCl_2$, 150 мМ NaCl и 0,5 мг/мл VLDL человека (INTRACEL), добавляли фермент HL человека или LPL человека (общий объем 10 мкл). После реакции при 37°C в течение 2 ч проводили определение свободной жирной кислоты (NEFA), образовавшейся из VLDL под действием фермента HL или LPL, с использованием NEFA C-test Wako (Wako), количество NEFA использовали в качестве показателя ферментативной активности. Ферментативную активность без добавления антитела против EL определяли как контрольную величину, и специфическую активность вычисляли против контрольной величины при каждой концентрации антитела (фиг. 2A-2K). Для сравнения, результат полностью соответствовал кривей ингибирования EL яванского макака. В результате было показано, что антитела 55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 13B3, 23H8, 16B3, 16E7, 14E1, 19E7 и 16F6 не ингибируют активность ни фермента HL, ни фермента LPL.

Справочный пример 7.

Измерение активности связывания антитела против EL с EL.

Буфер для анализа, содержащий 15 мкл антитела против EL, добавляли в микропланшет для титрования с иммобилизованным антителом против IgG-Fc мышь и инкубировали в течение 2 ч. После промывания лунок три раза 90 мкл буфера для промывания добавляли 15 мкл экстракта EL яванского макака, EL павиана, EL кролика, EL мышь, химерной EL человека[1-157]-мышь, химерной EL человека[1-305]-мышь или химерной EL человека[202-500]-мышь EL с гепарином и инкубировали при 4°C в течение 16 ч. После промывания лунок три раза 90 мкл буфера для промывания в лунки добавляли 15 мкл буфера для анализа, содержащего меченное биотином антитело против C2-метки и меченный HRP стрептавидин и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания лунок три раза 90 мкл буфера для промывания добавляли 15 мкл ТМВ+-субстрат-хромогена (ДАКО) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем добавляли 15 мкл 0,05 М H_2SO_4 и измеряли поглощение при 450 нм (фиг. 3A-3K).

В результате 55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 16B3 и 23H8 связывались с EL яванского макака, EL павиана и химерной EL человека[1-157]-мышь, но не связывались с EL мышь. Кроме того, 16B3 и 23H8 связывались с EL кролика, а 55A1, 7D4, 14A1 2D5 и 53A11 не связывались. С другой стороны, 16B3, 16E7, 14E1 и 19E7 связывались с EL яванского макака, EL павиана, химерной EL человека[1-305]-мышь

и химерной EL человека[202-500]-мышь, но не связывались с EL мышь и химерной EL человека[1-157]-мышь. Кроме того, 16B3, 14E1 и 19E7 связывались с EL кролика, а 16E7 не связывалось с ней.

Справочный пример 8.

Аффинность связывания антител против EL.

Аффинность связывания антител с EL измеряли с использованием Biacore. Антитело против C2-метки иммобилизовывали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare) с использованием способа присоединения аминов и добавляли экстракт EL павиана, EL яванского макака или химерной EL человека[1-305]-мышь и EL улавливали на сенсорном чипе. Затем добавляли антитела против EL и вычисляли аффинность связывания посредством двухвалентной аппроксимации программного обеспечения BIAevaluation. Результаты обобщенно представлены в табл. 1-3.

Таблица 1

Аффинность в отношении EL павиана			
Название клона	ka [1/Мс]	Kd [1/с]	K _D [M]
55A1	3,5×10 ⁵	4,2×10 ⁻⁴	1,2×10 ⁻⁹
7D4	7,8×10 ⁴	3,5×10 ⁻⁴	4,5×10 ⁻⁹
14A1	1,9×10 ⁵	6,2×10 ⁻⁴	3,3×10 ⁻⁹
2D5	7,7×10 ⁵	1,7×10 ⁻⁴	2,2×10 ⁻⁹
53A11	1,7×10 ⁵	2,6×10 ⁻⁴	1,6×10 ⁻⁹
13B3	6,1×10 ⁴	3,1×10 ⁻⁴	5,1×10 ⁻⁹
23H8	1,5×10 ⁵	4,4×10 ⁻⁴	2,9×10 ⁻⁹
16B3	3,1×10 ⁴	9,8×10 ⁻⁵	3,2×10 ⁻⁹
16E7	5,3×10 ⁴	2,5×10 ⁻⁴	4,7×10 ⁻⁹
14E1	1,5×10 ⁵	8,5×10 ⁻⁴	5,8×10 ⁻⁹
19E7	6,7×10 ⁴	8,3×10 ⁻⁴	1,2×10 ⁻⁹

Таблица 2

Аффинность в отношении EL яванского макака			
Название клона	ka [1/Мс]	Kd [1/с]	K _D [M]
55A1	2,5×10 ⁵	4,4×10 ⁻⁴	1,7×10 ⁻⁹
7D4	1,2×10 ⁵	2,3×10 ⁻⁴	1,9×10 ⁻⁹
14A1	2,1×10 ⁵	8,1×10 ⁻⁴	3,9×10 ⁻⁹
2D5	7,4×10 ⁵	2,8×10 ⁻⁴	3,8×10 ⁻⁹
53A11	9,1×10 ⁵	3,8×10 ⁻⁴	4,2×10 ⁻⁹
13B3	4,7×10 ⁴	4,1×10 ⁻⁴	8,7×10 ⁻⁹
23H8	1,2×10 ⁵	7,5×10 ⁻⁴	6,1×10 ⁻⁹
16B3	4,2×10 ⁵	8,9×10 ⁻⁵	2,1×10 ⁻⁹
16E7	3,2×10 ⁴	3,2×10 ⁻⁴	3,7×10 ⁻⁹
14E1	1,2×10 ⁵	6,9×10 ⁻⁴	5,9×10 ⁻⁹
19E7	5,5×10 ⁴	1,8×10 ⁻⁴	3,3×10 ⁻⁹

Таблица 3

Аффинность в отношении химерной EL человека[1-305]-мышь				
№	Название клона	ka [1/Мс]	Kd[1/с]	K _D [М]
1	55A1	1,9×10 ⁵	1,4×10 ⁻⁴	7,3×10 ⁻¹⁰
2	7D4	1,1×10 ⁵	1,1×10 ⁻⁴	9,7×10 ⁻¹⁰
3	14A1	2,1×10 ⁵	1,0×10 ⁻⁴	5,0×10 ⁻¹⁰
4	2D5	8,5×10 ⁴	9,3×10 ⁻⁵	1,1×10 ⁻⁹
5	53A11	1,8×10 ⁵	1,1×10 ⁻⁴	6,3×10 ⁻¹⁰
6	13B3	1,5×10 ⁵	1,4×10 ⁻⁴	9,1×10 ⁻¹⁰
7	23H8	1,2×10 ⁵	1,1×10 ⁻⁴	8,7×10 ⁻¹⁰
8	16B3	5,1×10 ⁴	1,9×10 ⁻⁵	3,7×10 ⁻⁹
9	16E7	9,5×10 ⁵	1,0×10 ⁻⁴	1,1×10 ⁻⁹
10	14E1	4,2×10 ⁴	2,3×10 ⁻⁴	5,4×10 ⁻⁹

Из результатов справочных примеров 5-8 характеристики антител против EL обобщенно представлены в табл. 4.

Таблица 4

№	Название клона	Подкласс	Нейтрализующая активность, IC50 [нМ]				Область EL, которая участвует в связывании антитела
			EL павиана	Химерная EL человека-мышь	EL яванского макака	EL кролика	
1	55A1	IgG2a	2,0	1,1	1,5	N.T.	1-157
2	7D4	IgG1	2,6	3,7	2,1	N.T.	1-157
3	14A1	IgG1	2,7	5,8	3,1	N.T.	1-157
4	2D5	IgG2a	2,9	2,7	3,0	N.T.	1-157
5	53A11	IgG2a	2,4	2,3	1,9	N.T.	1-157
6	13B3	IgG2a	2,6	4,1	1,7	13	1-157
7	23H8	IgG2a	3,2	1,7	2,7	67	1-157
8	16B3	IgG2a	3,0	1,3	1,9	6.3	202-305
9	16E7	IgG1	2,1	1,1	2,5	>40	202-305
10	14E1	IgG1	3,3	1,4	2,4	5,9	202-305
11	19E7	IgG2a	2,0	2,4	1,7	5,7	202-305

Справочный пример 9.

Получение антитела против EL, связывающегося с EL как человека, так и мышь.

Аденовирус, который экспрессирует EL мышь, получали с использованием того же способа, что и в примере 1, и иммунизировали им мышей с нокаутом EL. Аналогично тому, как и в примерах 4 и 5, получали антитело против EL (16F6), и его подкласс представлял собой IgG1. Нейтрализующую активность и аффинность связывания 16F6 определяли, и они представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Название клона	EL	Нейтрализующая активность, IC50 [нМ]
16F6	EL павиана	2,8
	Химерная EL человека (1-305)-мышь	4,0
	EL мышь	2,5
	EL кролика	2,3

Таблица 6

Название клона	EL	Аффинность		
		ka [1/Мс]	kd [1/с]	K _D [M]
16F6	Химерная EL	3,3×10 ⁵	4,0×10 ⁻³	1,4×10 ⁻⁸
	человека [1-305]-мышь			
	EL мыши	2,2×10 ⁵	1,5×10 ⁻⁴	6,8×10 ⁻¹⁰
	EL павиана	2,4×10 ⁵	1,0×10 ⁻⁴	4,2×10 ⁻¹⁰

Справочный пример 10.

Определение областей EL, участвующих в связывании антитела.

Область EL, которая участвует в связывании антитела, определяли посредством сканирующего мутагенеза по гомологии или аланин-сканирующего мутагенеза. Активность связывания антитела с мутантом EL анализировали с помощью ELISA. В аминокислотные остатки EL павиана вносили мутацию на аланин с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange (Agilent Technologies), однако в аминокислотные остатки, которые отличались от EL павиана и EL мыши, вносили мутации на аминокислотные остатки EL мыши. Экстракты мутантной EL с гепарином получали и активность связывания с антителом против EL определяли согласно примерам 2 и 8. Относительный эффект каждой мутации оценивали по следующей формуле:

([концентрация антитела, при которой величина A450 показала 1,0]-мутантная EL)/([концентрация антитела, при которой величина A450 показала 1,0]-EL дикого типа).

Относительная активность связывания мутантной EL павиана с антителами против EL (55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 16B3 или 23H8) представлена на фиг. 7A-7C. Относительная активность связывания мутантной EL павиана с антителами против EL (16B3, 16E7, 14E1, 19E7 или 16F6) также представлена на фиг. 7H-7L.

Из информации, представленной на фиг. 7A-7G, было показано, что важными аминокислотами для связывания антитела 55A1, 7D4, 14A1, 2D5, 53A11, 16B3 или 23H8 и EL являются аргинин в положении 50, глутаминовая кислота в положении 60, гистидин в положении 61, тирозин в положении 65 и аспарагин в положении 100 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Из информации на фиг. 7H-7K было показано, что важными аминокислотами для связывания антитела 16B3, 16E7, 14E1 или 19E7 и EL являются гистидин в положении 220, треонин в положении 221, тирозин в положении 222, треонин в положении 223, аргинин в положении 224, фенилаланин в положении 226, глицин в положении 227, глицин в положении 231, изолейцин в положении 232, глутамин в положении 233, метионин в положении 234, аспарагиновая кислота в положении 240, тирозин в положении 242, пролин в положении 243, аспарагин в положении 244, глицин в положении 246, глутамин в положении 249, пролин в положении 250, глицин в положении 251, лейцин в положении 254, лейцин в положении 258, тирозин в положении 263, валин в положении 269 и глутаминовая кислота в положении 273 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Справочный пример 11.

Анализ аминокислотной последовательности варибельной области антител против EL.

Аминокислотную последовательность варибельной области антитела против EL определяли с использованием общепринятой методики, и она описана на фиг. 4A-L.

Настоящее изобретение описано более подробно ниже с помощью примеров. Однако настоящее изобретение не ограничивается следующими примерами. Если нет иных указаний, в качестве методики получения антитела авторы настоящего изобретения использовали способы, описанные в *Immunochemistry in Practice* (Blackwell Scientific Publications). Также, если нет иных указаний, в качестве способов генной инженерии авторы настоящего изобретения использовали способы, описанные в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory).

Пример 1.

Гуманизация моноклонального антитела мыши.

Семь моноклональных антител мыши (16B3, 55A1, 53A11, 23H8, 16B3 и 16F6), которые получали, как описано выше, и 12B10, которое описано в WO 2013/054830, гуманизировали. Более конкретно, гуманизацию проводили путем встраивания последовательности гуманизированной варибельной области, которая представляет собой пересаживаемые CDR каждого антитела мыши, в плазмиду на основе pcDNA, кодирующую последовательности доменов константной области каппа человека или гамма-1 человека.

Аналогично тому, как описано выше, получали 11 гуманизированных антител: h16B3-S1, h16B3-S2, h16B3-S3, h16B3-S4, h16B3-S5, h16B3-S6, h16B3-S7, h16B3-S8, h16B3-F1, h16B3-F2 и h16B3-F3, происходящих из 16B3 мыши. Выравнивание варибельных областей этих гуманизированных антител представлено на фиг. 8A-8D.

Аналогично тому, как описано выше, было получено 13 гуманизированных антител h55A1-S1, h55A1-S2, h55A1-S3, h55A1-S4, h55A1-S5, h55A1-S6, h55A1-S7, h55A1-F1, h55A1-F2, h55A1-F3, h55A1-F4, h55A1-F5 и h55A1-F6, происходящих из 55A1 мыши. Выравнивание переменных областей этих гуманизированных антител представлено на фиг. 9A-9D.

Аналогично тому, как описано выше, было получено четыре гуманизированных антитела h53A11-S1, h53A11-S2, h53A11-S3 и h53A11-S4, происходящих из 53A11 мыши. Выравнивание переменных областей этих гуманизированных антител представлено на фиг. 10A, 10B.

Аналогично тому, как описано выше, было получено три гуманизированных антитела h23H8-S1, h23H8-S2 и h23H8-S3, происходящих из 23H8 мыши. Выравнивание переменных областей этих гуманизированных антител представлено на фиг. 11A, 11B.

Аналогично тому, как описано выше, было получено четыре гуманизированных антитела h13B3-S1, h13B3-S2, h13B3-S3 и h13B3-S4, происходящих из 16B3 мыши. Выравнивание переменных областей этих гуманизированных антител представлено на фиг. 12A, 12B.

Аналогично тому, как описано выше, было получено четыре гуманизированных антитела h12B10-S1, h12B10-S2, h12B10-S3 и h12B10-S4, происходящих из 12B10 мыши. Выравнивание переменных областей этих гуманизированных антител представлено на фиг. 13A, 13B.

Аналогично тому, как описано выше, было получено пять гуманизированных антител h16F6-S1, h16F6-S2, h16F6-S3, h16F6-S4 и h16F6-S5, происходящих из 16F6 мыши. Выравнивание переменных областей этих гуманизированных антител представлено на фиг. 14A, 14B.

Аминокислотные последовательности переменных областей этих 44 гуманизированных антител обобщенно представлены в табл. с 7-1 по 7-2 и показаны на фиг. 15-21.

Таблица 7

mAb	Тяжелая цепь			Легкая цепь		
	VH	JH	Мутация	VK	JK	Мутация
h16B3-S1	3-23*04	6*01		4-1*01	2*01	
h16B3-S2	3-23*04	6*01	K94R	4-1*01	2*01	
h16B3-S3	3-23*04	6*01	K94R, R98K, Y100BF	4-1*01	2*01	
h16B3-S4	3-23*04	6*01	K94R, R98K, Y100BF	4-1*01	2*01	K93R
h16B3-S5	3-23*04	6*01	K94R, R98K, H100R, Y100BF, V102L	4-1*01	2*01	
h16B3-S6	3-23*04	6*01	K94R, R98K, H100R, Y100BF, V102L	4-1*01	2*01	K93R
h16B3-S7	3-23*04	6*01	G31A, E50D, K94R, R98K, H100R, Y100BF, V102L	4-1*01	2*01	
h16B3-S8	3-23*04	6*01	G31A, E50D, K94R, R98K, H100R, Y100BF, V102L	4-1*01	2*01	K93R
h16B3-F1	3-23*04	6*01	K94R	1-39*01	2*01	
h16B3-F2	3-23*04	6*01	K94R	3-15*01	2*01	
h16B3-F3	3-23*04	6*01	K94R	3-20*01	2*01	
h55A1-S1	7-4-1*01	6*03		7-3*01	4*02	
h55A1-S2	7-4-1*01	6*03	M34L, Y100BF	7-3*01	4*02	
h55A1-S3	7-4-1*01	6*03	M34L, Y100BF	7-3*01	4*02	Q90N
h55A1-S4	7-4-1*01	6*03	G33A, P57G, Y97F, Y100BF	7-3*01	4*02	
h55A1-S5	7-4-1*01	6*03	G33A, P57G, Y97F, Y100BF	7-3*01	4*02	Q90N
h55A1-S6	7-4-1*01	6*03	G33A, M34L, P57G, D62E, Y97F, Y100BF	7-3*01	4*02	
h55A1-S7	7-4-1*01	6*03	G33A, M34L, P57G, D62E, Y97F, Y100BF	7-3*01	4*02	Q90N
h55A1-F1	7-4-1*01	6*03		1-33*01	4*02	
h55A1-F2	1-18*01	6*03		3-15*01	4*02	
h55A1-F3	1-18*01	6*03		1-39*01	4*02	
h55A1-F4	1-18*01	6*03		3-20*01	4*02	

h55A1-F5	1-46*01	6*03		1-39*01	4*02	
h55A1-F6	1-46*01	6*03		3-15*01	4*02	
h53A11-S1	1-3*01	6*02	R94K	3-15*01	2*01	P8L, Y49K
h53A11-S2	1-3*01	6*02	R94K	3-15*01	2*01	P8L
h53A11-S3	1-3*01	6*02	R94K	3-15*01	2*01	Y49K
h53A11-S4	1-3*01	6*02		3-15*01	2*01	Y49K
h23H8-S1	1-2*02	6*02		1-39*01	2*01	
h23H8-S2	1-2*02	6*02		1-39*01	2*01	Y49S, P80R
h23H8-S3	1-2*02	6*02		1-39*01	2*01	Y49S
h13B3-S1	1-46*03	6*01		3-20*01	4*01	
h13B3-S2	1-2*01	6*01		3-20*01	4*01	
h13B3-S3	1-46*03	6*01		3-11*01	4*01	
h13B3-S4	1-2*01	6*01		3-11*01	4*01	
h12B10-S1	3-33*01	5*01	S95D, Y96H, D97L, G98A, S99Y, P100Y, P101D, S102V	1-33*01	2*04	
h12B10-S2	3-33*01	5*01	S95D, Y96H, D97L, G98A, S99F, P100Y, P101D, S102L	1-33*01	2*04	
h12B10-S3	3-33*01	5*01	S95D, Y96H, D97L, G98A, S99F, P100F, P101D, S102L	1-33*01	2*04	
h12B10-S4	3-33*01	5*01	T31S, S95D, Y96H, D97L, G98V, S99F, P100F, P101D, S102L	1-33*01	2*04	
h16F6-S1	1-46*01	6*01	R94V	1-39*01	4*01	A43S
h16F6-S2	1-46*01	6*01	R94V	1-39*01	4*01	A43S, S67A
h16F6-S3	1-46*01	6*01	R94V	1-39*01	4*01	A43S, S63T, S67A
h16F6-S4	1-46*01	6*01	R94V	1-39*01	4*01	A43S, S63T, S67A, L73F
h16F6-S5	1-46*01	6*01	R94V	1-39*01	4*01	T20S, A43S, S63T, S67A, L73F

Пример 2.

Измерение ингибиторной активности гуманизованного антитела против EL.

Гуманизованные антитела получали из плазмидного вектора, как описано в примере 1. Ингибиторную активность очищенных на колонке с белком А гуманизованных антител против EL в отношении EL человека, химерной EL человека[1-305]-мышь, химерной EL человека[331-459]-мышь, EL яванского макака или EL мышь измеряли следующим образом. Раствор гуманизованного антитела против EL, буфера для анализа (20 мМ Tris/HCl (pH 7,5), 0,5% BSA, 4 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl) и 2 мг/мл HDL человека (Athens Research & Technology) смешивали в микропланшете для титрования, а затем добавляли экстракт EL с гепарином. После инкубации при 37°C в течение 90 мин определяли высвобождение неэтерифицированной жирной кислоты (NEFA) из HDL с использованием коммерчески доступного набора (NEFA C test-Wako, Wako). Количество NEFA использовали в качестве показателя ферментативной активности. Ферментативную активность без добавления гуманизованного антитела против EL определяли в качестве контрольной величины и специфическую активность вычисляли против контрольной величины при каждой концентрации гуманизованного антитела против EL. Концентрацию гуманизованного антитела против EL, при которой ингибировалось 50% активности EL, вычисляли из кривой ингибирования в качестве величины IC₅₀. Результат обобщенно представлен в табл. 8-11.

Происходящие из 16B3 мышь гуманизованные антитела h16B3-S1, h16B3-S2, h16B3-S3, h16B3-S4, h16B3-S5, h16B3-S6, h16B3-S7, h16B3-S8, h16B3-F1, h16B3-F2 и h16B3-F3 продемонстрировали приблизительно такую же или увеличенную активность нейтрализации. Исходя из результата, К или R в положении 94 тяжелой цепи, G или A в положении 31 тяжелой цепи, E или D в положении 50 тяжелой цепи, R или K в положении 98 тяжелой цепи, H или R в положении 100 тяжелой цепи, Y или F в положении 100B тяжелой цепи, V или L в положении 102 тяжелой цепи и K или R в положении 93 легкой цепи считали приемлемыми. Кроме того, последовательности эмбрионального типа человека IGKV4-1×01, IGKV1-39×01, IGKV3-15×01 или IGKV3-20×01 рассматривали для применения в качестве акцепторов для CDR легкой цепи мышь.

Происходящие из 55A1 мышь гуманизованные антитела h55A1-S1, h55A1-S2, h55A1-S3, h55A1-S4, h55A1-S5, h55A1-S6, h55A1-S7, h55A1-F1, h55A1-F2, h55A1-F3, h55A1-F4, h55A1-F5 и h55A1-F6 продемонстрировали приблизительно такую же или увеличенную активность нейтрализации. Исходя из результата, G или A в положении 33 тяжелой цепи, M или L в положении 34 тяжелой цепи, P или G в положении 57 тяжелой цепи, D или E в положении 62 тяжелой цепи, Y или F в положении 97 тяжелой цепи, Y или F в положении 100B тяжелой цепи и Q или N в положении 90 легкой цепи считались приемлемыми. Кроме того, последовательности эмбрионального типа человека IGHV7-4-1×02, IGHV1-18×01 или IGHV1-46×01 рассматривались для применения в качестве акцепторов для CDR тяжелой цепи и IGKV7-3×01, IGKV1-33×01, IGKV1-39×01, IGKV3-15×01 или IGKV3-20×01 рассматривались для приме-

нения в качестве акцепторов для CDR легкой цепи.

Происходящие из 53A11 мыши гуманизированные антитела h53A11-S1, h53A11-S2 и h53A11-S3 продемонстрировали приблизительно такую же или увеличенную активность нейтрализации, хотя h53A11-S4 продемонстрировало сниженную активность нейтрализации. Исходя из этого результата, считается желательной комбинация мутации R94K тяжелой цепи и мутации P8L легкой цепи или комбинация мутации R94K тяжелой цепи и мутации Y49K легкой цепи.

Происходящие из 23H8 мыши гуманизированные антитела h23H8-S2 и h23H8-S3 продемонстрировали приблизительно такую же или увеличенную активность нейтрализации, хотя h23H8-S1 продемонстрировало сниженную активность нейтрализации. Исходя из результата, считается желательной комбинация мутаций Y49S и P80R легкой цепи.

Происходящие из 16B3 мыши гуманизированные антитела h13B3-S1, h13B3-S2, h13B3-S3 и h13B3-S4 продемонстрировали приблизительно такую же или увеличенную активность нейтрализации.

Происходящие из 12B10 мыши гуманизированные антитела h12B10-S1, h12B10-S2, h12B10-S3 и h12B10-S4 продемонстрировали приблизительно такую же или увеличенную активность нейтрализации.

Происходящие из 16F6 мыши гуманизированные антитела h16F6-S1, h16F6-S2, h16F6-S3, h16F6-F4, h16F6-F5 и h16F6-S5 продемонстрировали приблизительно такую же или увеличенную активность нейтрализации. Исходя из результата, считается желательной комбинация мутации R94V тяжелой цепи и мутации A43S легкой цепи. Кроме того, T или S в положении 20 легкой цепи, S или T в положении 63 легкой цепи, S или A в положении 67 легкой цепи, L или F в положении 73 легкой цепи считались приемлемыми.

Таблица 8

mAb	Нейтрализующая активность, IC50 [нМ]
	ЕЛ человека
h16B3-S2	4, 6
h55A1-S1	3, 9
h53A11-S1	9, 7
h23H8-S2	4, 5
h13B3-S1	2, 3

Таблица 9

mAb	Нейтрализующая активность, IC50 [нМ]
	Химерная ЕЛ
16B3 (mAb мыши)	1, 3
h16B3-S1	2, 7
h16B3-S2	5, 3
h16B3-S3	1, 9
h16B3-S4	1, 7
h16B3-S5	1, 2
h16B3-S6	1, 0
h16B3-S7	1, 4
h16B3-S8	1, 4
h16B3-F1	2, 3
h16B3-F2	2, 4
h16B3-F3	2, 0
55A1 (mAb мыши)	1, 1
h55A1-S1	2, 2
h55A1-S2	1, 1
h55A1-S3	1, 2
h55A1-S4	1, 1
h55A1-S5	1, 3
h55A1-S6	1, 2
h55A1-S7	1, 0
h55A1-F1	1, 9
h55A1-F2	2, 1
h55A1-F3	1, 1
h55A1-F4	2, 4

h55A1-F5	1,3
h55A1-F6	2,3
53A11 (mouse mAb)	2,6
h53A11-S1	2,1
h53A11-S2	2,7
h53A11-S3	1,8
23H8 (mAb мыши)	1,7
h23H8-S2	1,7
h23H8-S3	2,0
13B3 (mAb мыши)	4,1
h13B3-S1	3,0
h13B3-S2	9,0
h13B3-S3	2,1
h13B3-S4	2,6
12B10 (mAb мыши)	15
h12B10-S1	6,0
h12B10-S2	5,4
h12B10-S3	4,9
h12B10-S4	6,2

Таблица 10

mAb	Нейтрализующая активность, IC50 [нМ]	
	Яванская макака EL	
16B3 (mAb мыши)	1,8	
h16B3-S1	3,6	
h16B3-S2	1,9	
55A1 (mAb мыши)	1,3	
h55A1-S1	1,6	
53A11 (mAb мыши)	2,7	
h53A11-S1	1,7	
h53A11-S2	1,8	
h53A11-S3	1,2	
h53A11-S4	12	
23H8 (mAb мыши)	1,4	
h23H8-S1	26	
h23H8-S2	1,7	
h23H8-S3	1,8	
13B3 (mAb мыши)	3,1	
h13B3-S1	2,4	
h13B3-S2	3,6	
h13B3-S3	4,1	
h13B3-S4	2,9	

Таблица 11

mAb	Нейтрализующая активность, IC50 [нМ]	
	EL павиана	мыши
h16F6-S1	2,6	3,1
h16F6-S2	3,3	3,0
h16F6-S3	3,1	3,3
h16F6-S4	2,6	2,0
h16F6-S5	2,0	2,1

Пример 3.

Измерение ингибиторной активности гуманизированного антитела против EL в отношении HL и LPL.

ДНК, кодирующую HL человека, клонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Invitrogen). Экспрессирующий вектор трансфицировали в клетки HEK293F и культивировали при 37°C, 8% CO₂, в течение 2 суток. Клетки центрифугировали и собирали, клетки ресуспендировали PBS, содержащим 20 Ед./мл гепарина (SIGMA). Суспензию клеток инкубировали при 37°C в течение 45 мин. Супернатант, полученный удалением клеток посредством центрифугирования, использовали в качестве раствора фермента HL человека. Раствор фермента LPL человека получали с использованием того же способа. После добавления антитела против EL в раствор, содержащий буфер 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,5% бычий сывороточный альбумин, 4 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl и 0,5 мг/мл VLDL человека (INTRACEL), добавляли фермент HL человека или LPL человека (общий объем 10 мкл). После реакции при 37°C в течение 2 ч проводили определение свободной жирной кислоты (NEFA), образовавшейся из VLDL под действием фермента HL или LPL с использованием NEFA C-test Wako (Wako), количество NFFA использовали в качестве показателя ферментативной активности. Ферментативную активность без добавления антитела против EL определяли как контрольную величину и специфическую активность вычисляли против контрольной величины при каждой концентрации антитела. Концентрацию гуманизированного антитела против EL, при которой ингибировалось 50% активности EL, вычисляли из кривой ингибирования в качестве величины IC₅₀. Результат представлен в табл. 12. В результате было показано, что гуманизированные антитела h16B3-S2, h55A1-S1, h53A11-S1, h23H8-S2 и h13B3-S1 не ингибировали ферментативную активность ни HL, ни LPL.

Таблица 12

mAb	Нейтрализующая активность, IC ₅₀ [нМ]	
	HL человека	LPL человека
h16B3-S2	>400	>400
h55A1-S1	>1800	>1800
h53A11-S1	>400	>400
h23H8-S2	>400	>400
h13B3-S1	>400	>400

Пример 4.

Аффинность связывания гуманизированного антитела против EL.

Аффинность связывания антител против EL измеряли с использованием Biacore. Антитело против С2-метки иммобилизовывали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare) с использованием способа присоединения аминов и добавляли экстракт химерной EL человека[1-305]-мышь, химерной EL человека[331-459]-мышь, EL яванского макака или EL мышь с гепарином и EL улавливали на сенсорном чипе. Затем добавляли гуманизированные антитела против EL и вычисляли аффинность связывания с помощью двухвалентной аппроксимации программного обеспечения BIAevaluation. Результаты обобщенно представлены в табл. 13-15.

Таблица 13

mAb	Аффинность в отношении химерной EL человека-мыши		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
h16B3-S2	2,4×10 ⁴	2,2×10 ⁻⁴	9,3×10 ⁻⁹
h16B3-S3	3,0×10 ⁴	1,3×10 ⁻⁴	4,5×10 ⁻⁹
h16B3-S4	6,1×10 ⁴	1,8×10 ⁻⁴	3,0×10 ⁻⁹
h16B3-S5	5,4×10 ⁴	5,7×10 ⁻⁵	1,0×10 ⁻⁹
h16B3-S6	6,0×10 ⁴	5,8×10 ⁻⁵	1,0×10 ⁻⁹
h16B3-S7	5,0×10 ⁴	5,9×10 ⁻⁵	1,2×10 ⁻⁹
h16B3-S8	5,2×10 ⁴	4,0×10 ⁻⁵	7,8×10 ⁻¹⁰
h16B3-F1	3,8×10 ⁴	2,0×10 ⁻⁴	5,2×10 ⁻⁹
h16B3-F2	2,9×10 ⁴	1,1×10 ⁻⁴	3,8×10 ⁻⁹
h16B3-F3	1,9×10 ⁴	2,0×10 ⁻⁴	1,0×10 ⁻⁸
h55A1-S1	2,7×10 ⁴	8,6×10 ⁻⁴	3,1×10 ⁻⁸
h55A1-S2	3,5×10 ⁴	3,7×10 ⁻⁴	1,1×10 ⁻⁸
h55A1-S3	1,2×10 ⁵	5,1×10 ⁻⁴	4,2×10 ⁻⁹
h55A1-S4	8,0×10 ⁴	2,4×10 ⁻⁴	3,0×10 ⁻⁹
h55A1-S5	2,7×10 ⁴	3,3×10 ⁻⁴	1,2×10 ⁻⁸
h55A1-S6	4,7×10 ⁴	6,3×10 ⁻⁵	1,4×10 ⁻⁹
h55A1-S7	1,1×10 ⁵	5,5×10 ⁻⁴	5,1×10 ⁻⁹
h55A1-F1	2,0×10 ⁵	1,7×10 ⁻⁵	8,4×10 ⁻¹¹
h55A1-F2	1,6×10 ⁵	2,6×10 ⁻⁵	1,7×10 ⁻¹⁰
h55A1-F3	1,1×10 ⁵	3,3×10 ⁻⁵	2,9×10 ⁻¹⁰
h55A1-F4	1,4×10 ⁵	3,0×10 ⁻⁵	2,2×10 ⁻¹⁰
h55A1-F5	1,4×10 ⁵	1,6×10 ⁻⁵	1,1×10 ⁻¹⁰
h55A1-F6	1,6×10 ⁵	4,8×10 ⁻⁶	3,0×10 ⁻¹⁰
h12B10-S1	1,9×10 ⁵	3,5×10 ⁻⁴	1,9×10 ⁻⁹
h12B10-S2	2,4×10 ⁵	3,3×10 ⁻⁵	1,4×10 ⁻¹⁰
h12B10-S3	1,5×10 ⁵	1,7×10 ⁻⁵	1,1×10 ⁻¹⁰
h12B10-S4	5,5×10 ⁵	3,9×10 ⁻⁵	7,2×10 ⁻¹⁰

Таблица 14

mAb	Аффинность в отношении ЕL яванского макака		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
h16B3-S1	$9,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-8}$
h16B3-S2	$5,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-9}$
h55A1-S1	$4,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-10}$
h53A11-S1	$1,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-9}$
h53A11-S2	$1,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-9}$
h53A11-S3	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-9}$
h23H8-S1	$1,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-8}$
h23H8-S2	$2,3 \times 10^5$	$9,9 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-9}$
h23H8-S3	$3,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-10}$
h13B3-S1	$7,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-9}$
h13B3-S2	$4,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-9}$
h13B3-S3	$6,6 \times 10^4$	$8,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-8}$
h13B3-S4	$1,1 \times 10^5$	$3,8 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-9}$

Таблица 15

mAb	Аффинность в отношении ЕL павиана			Аффинность в отношении ЕL МЫШИ		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
h16F6-S1	$1,3 \times 10^6$	$7,4 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-10}$	$1,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-10}$

Промышленная применимость

Гуманизированное моноклональное антитело, которое ингибирует ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы по настоящему изобретению, является пригодным в качестве лекарственного средства для предупреждения и/или лечения дислипидемии, гиперлипидемии, атеросклероза, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, диабета, ожирения и/или синдрома Х, поскольку оно обладает селективной ингибиторной активностью в отношении сосудисто-эндотелиальной липазы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное моноклональное антитело, которое ингибирует ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы, или фрагмент антитела, который ингибирует ферментативную активность сосудисто-эндотелиальной липазы, где антитело или фрагмент антитела выбрано из группы, состоящей из:

1) гуманизированного моноклонального антитела или его фрагмента с вариабельной областью тяжелой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20, и вариабельной областью легкой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18;

2) гуманизированного моноклонального антитела или его фрагмента с вариабельной областью тяжелой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20, и вариабельной областью легкой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21;

3) гуманизированного моноклонального антитела или его фрагмента с вариабельной областью тяжелой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24, и вариабельной областью легкой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18;

4) гуманизованного моноклонального антитела или его фрагмента с вариабельной областью тяжелой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24, и вариабельной областью легкой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21;

5) гуманизованного моноклонального антитела или его фрагмента с вариабельной областью тяжелой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24, и вариабельной областью легкой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18;

6) гуманизованного моноклонального антитела или его фрагмента с вариабельной областью тяжелой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24, и вариабельной областью легкой цепи, включающей три CDR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

2. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с сосудисто-эндотелиальной липазой, содержащая гуманизованное моноклональное антитело или его фрагмент по п.1.

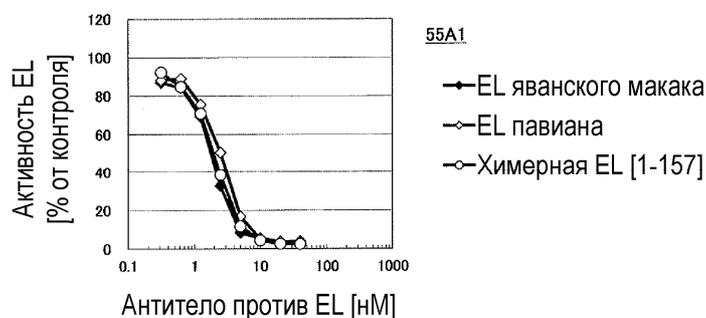
3. Фармацевтическая композиция по п.2, где заболевание, ассоциированное с сосудисто-эндотелиальной липазой, представляет собой дислипидемию.

4. Применение гуманизованного моноклонального антитела или его фрагмента по п.1 для лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с сосудисто-эндотелиальной липазой.

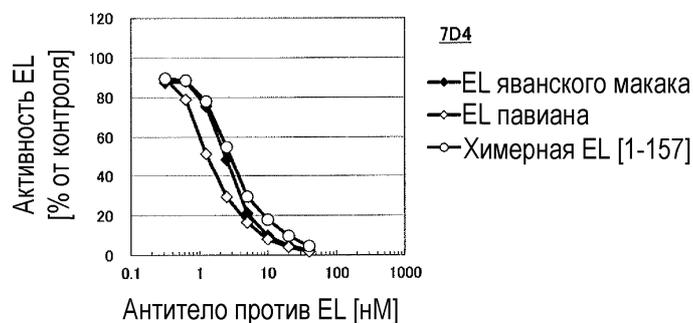
5. Применение по п.4, где заболевание, ассоциированное с сосудисто-эндотелиальной липазой, представляет собой дислипидемию.

6. Способ лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с сосудисто-эндотелиальной липазой, отличающийся введением моноклонального антитела или его фрагмента по п.1.

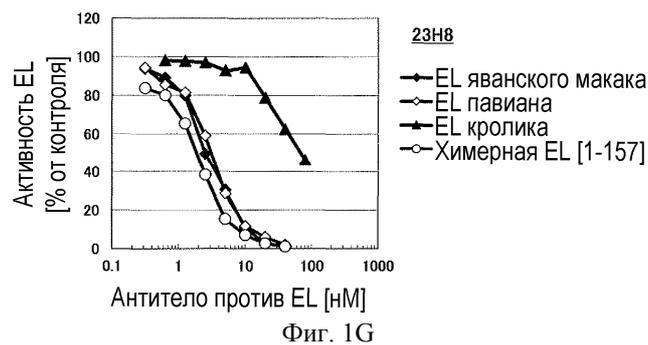
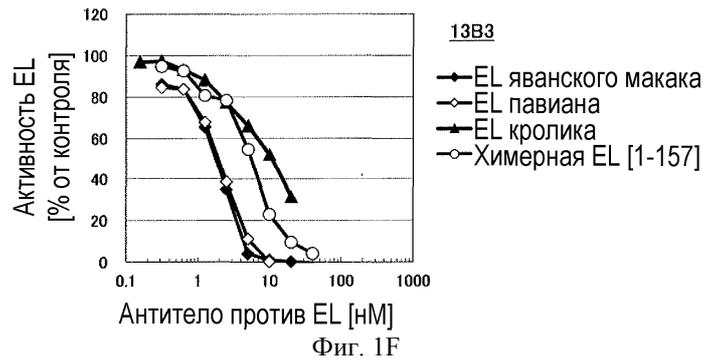
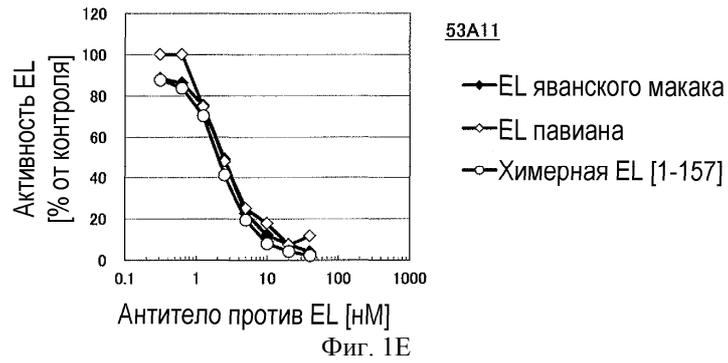
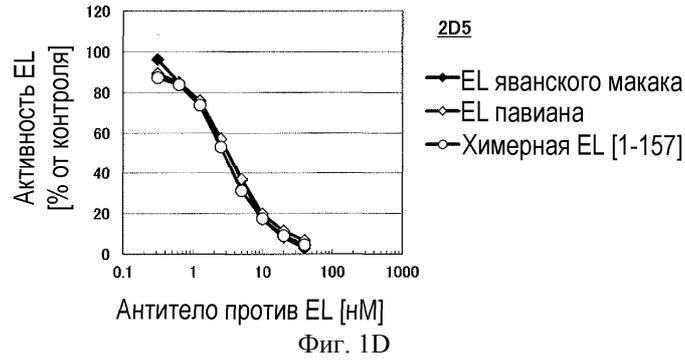
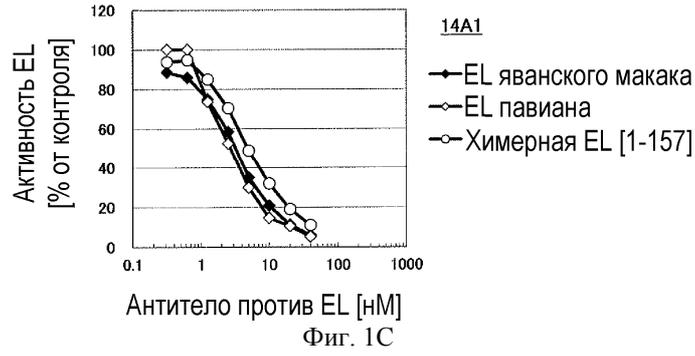
7. Способ по п.6, где заболевание, ассоциированное с сосудисто-эндотелиальной липазой, представляет собой дислипидемию.

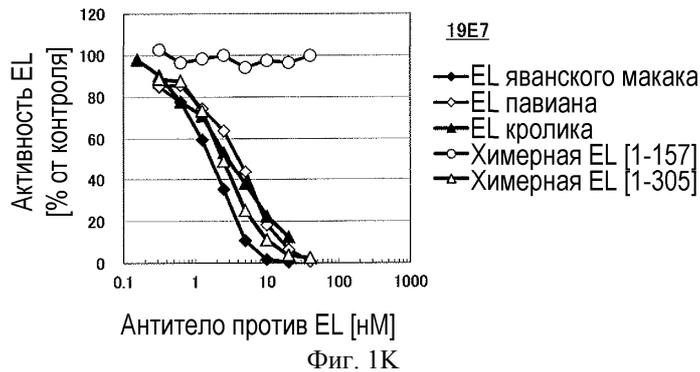
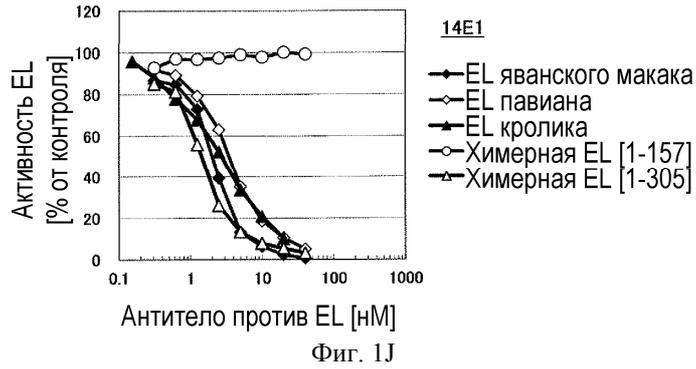
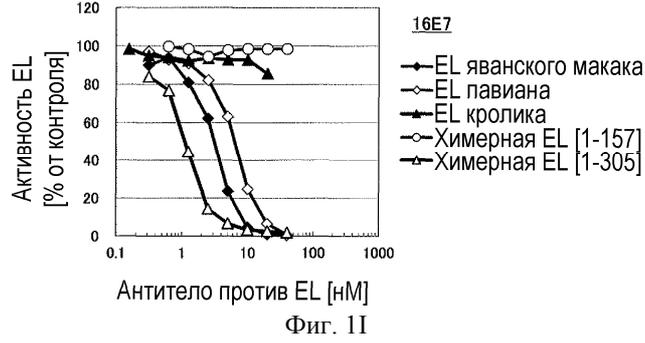
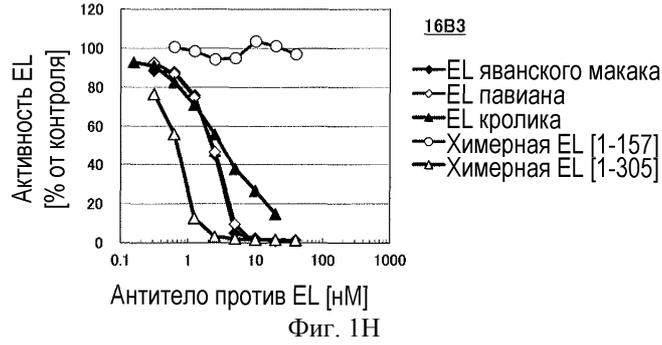


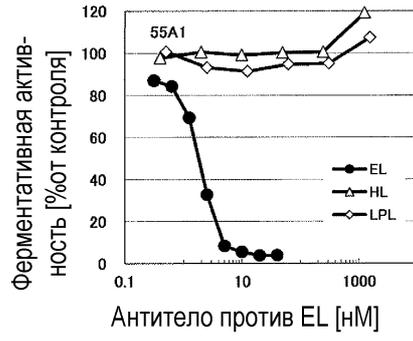
Фиг. 1А



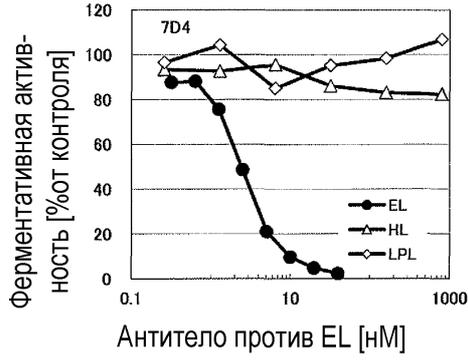
Фиг. 1В



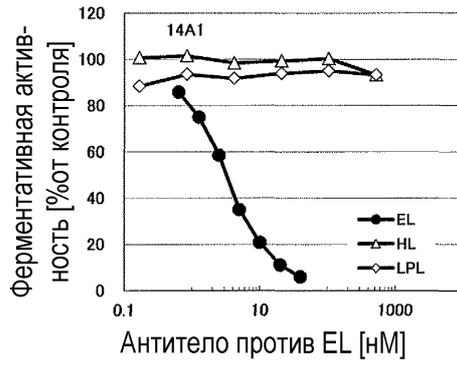




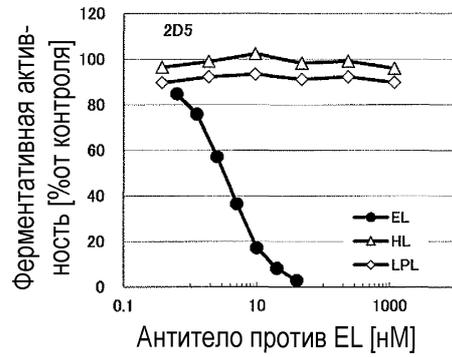
Фиг. 2А



Фиг. 2В

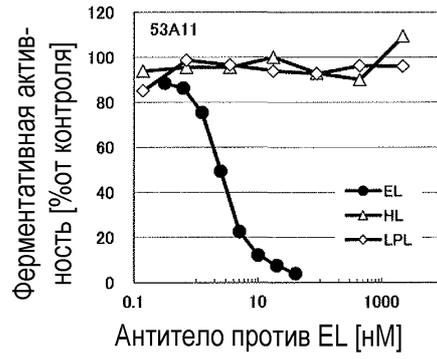


Фиг. 2С

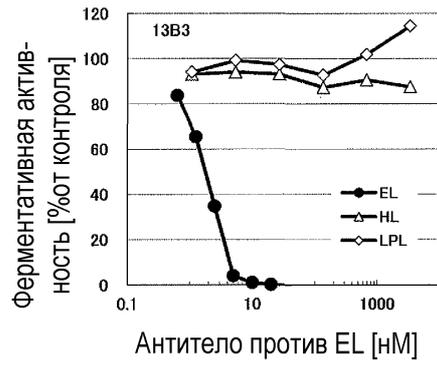


Фиг. 2D

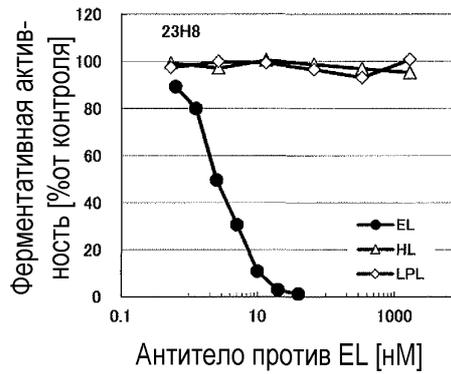
036324



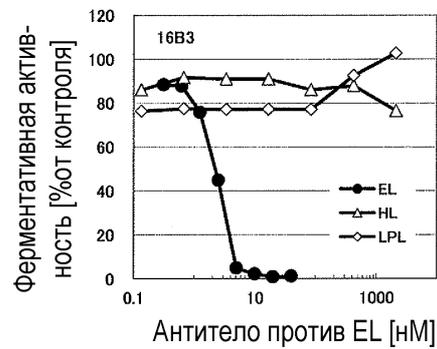
Фиг. 2E



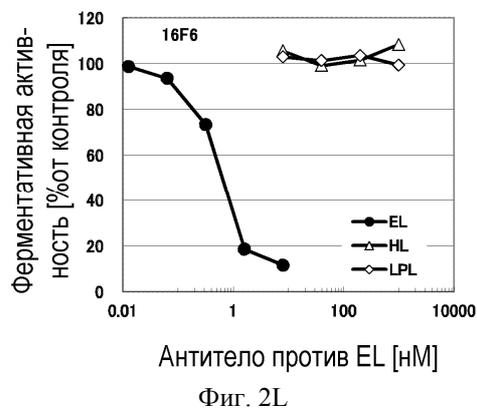
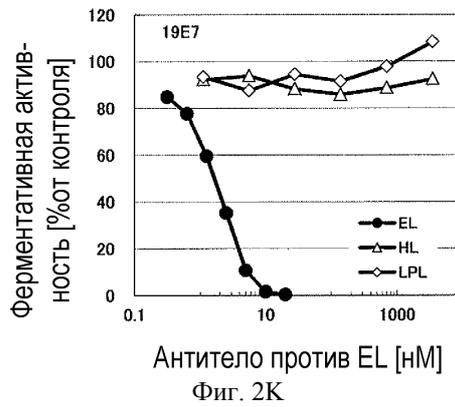
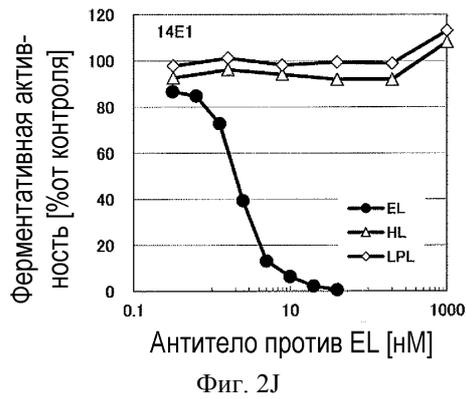
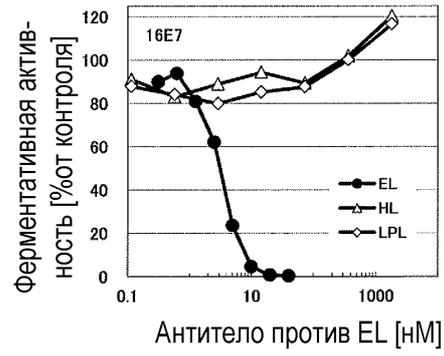
Фиг. 2F

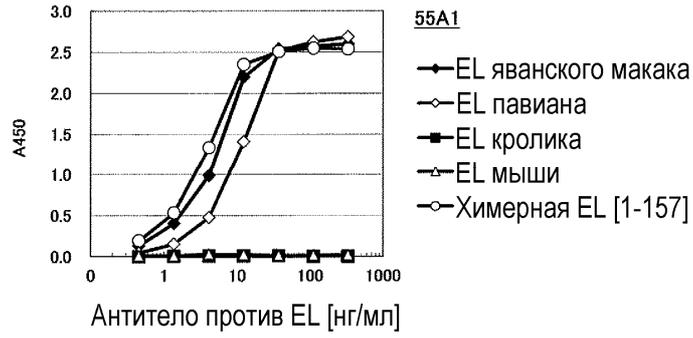


Фиг. 2G

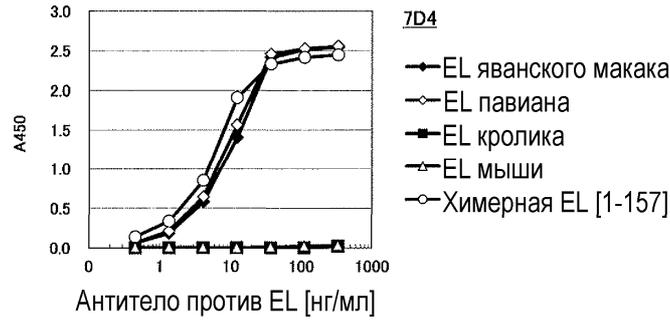


Фиг. 2H

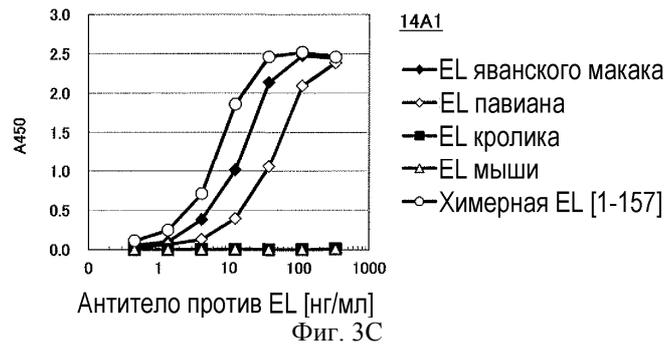




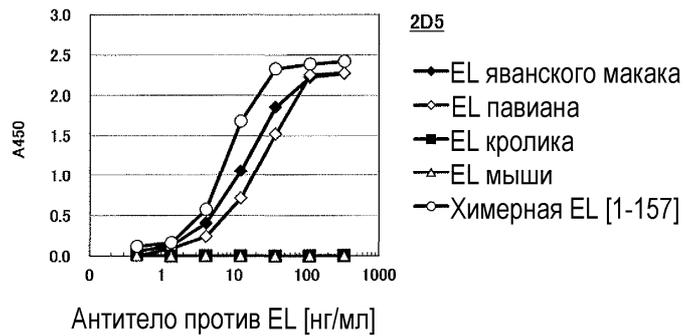
Фиг. 3А



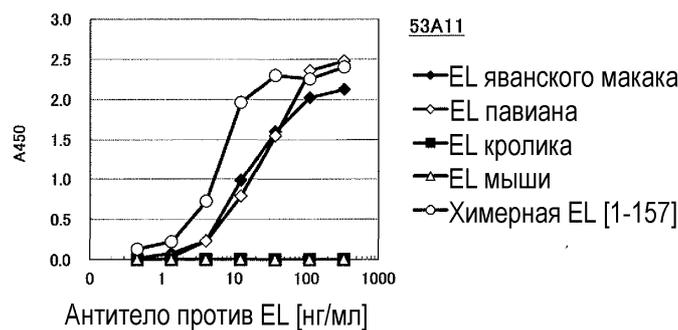
Фиг. 3В



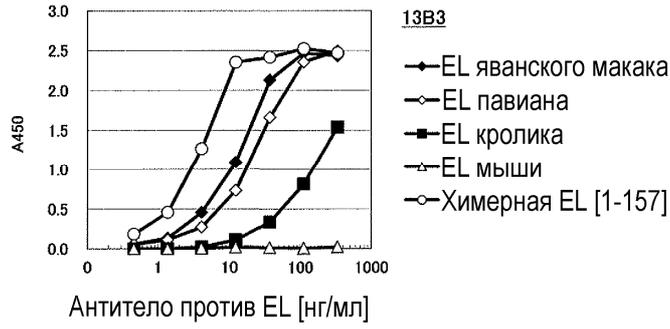
Фиг. 3С



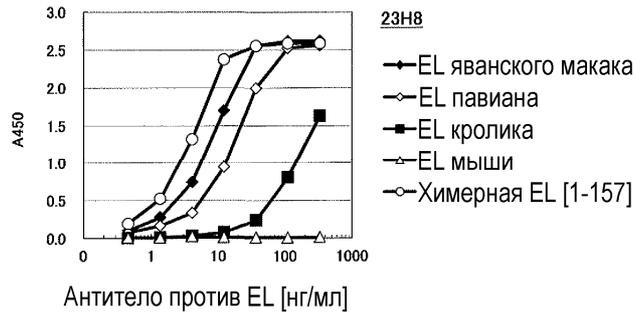
Фиг. 3D



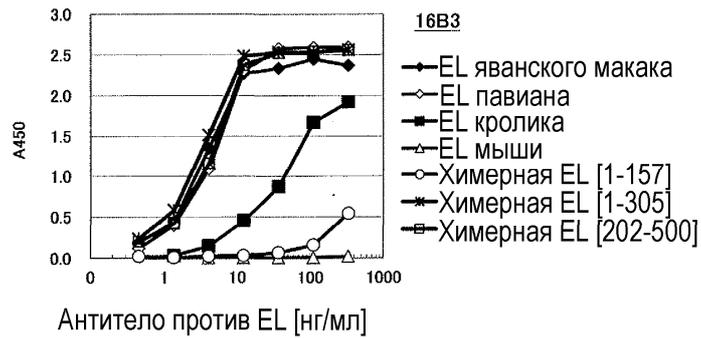
Фиг. 3Е



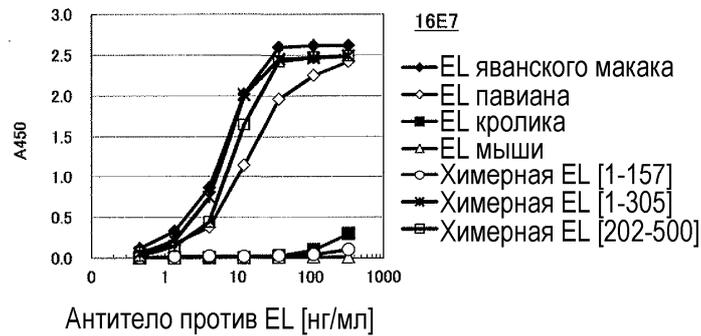
Фиг. 3F



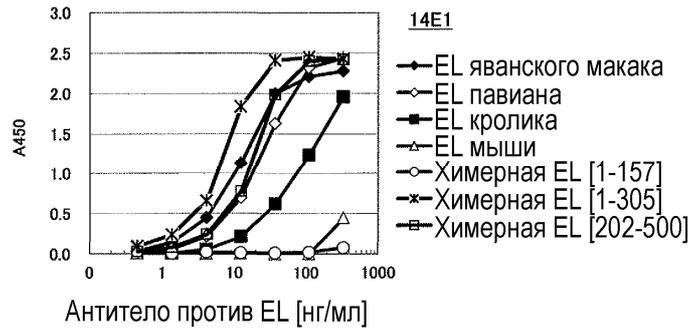
Фиг. 3G



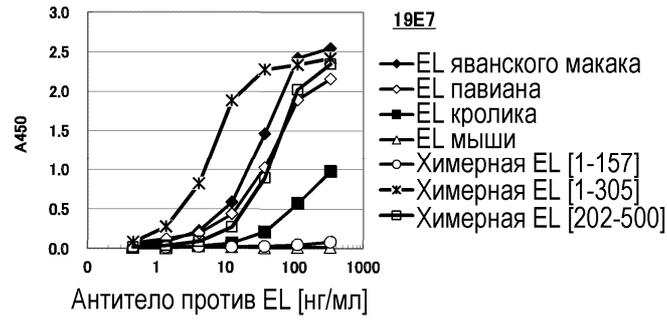
Фиг. 3H



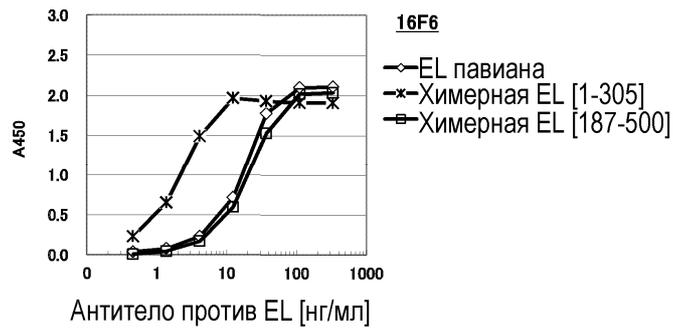
Фиг. 3I



Фиг. 3J



Фиг. 3K



Фиг. 3L

Тяжелая цепь 55A1

CDR1 CDR2

QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYAGDF
 KGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNETATYFCARRGYGRRYFDVWGTGTTVTVSS

CDR3

Легкая цепь 55A1

CDR1 CDR2

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDVDSYMHWYQKPGPPKLLIYAASNLASGI
 PARFSGGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYYCQQTIEDPPTFGGGTKLEIK

CDR3

Фиг. 4A

036324

Тяжелая цепь 7D4

CDR1 CDR2
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKDLKWMGWINTYSGVPTYADDF
KGRFAFSLETSASTAYLQINNPKNEDTATYFCARFSYGRHYFDYWGQGTTLTVSS
CDR3

Легкая цепь 7D4

CDR1 CDR2
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSYMNWYQKPGQPPQLLIYAASNLSGSI
PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCHQSTDDPPWTFGGGKLEIK
CDR3
Фиг. 4B

Тяжелая цепь 14A1

CDR1 CDR2
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKDLKWMGWINTYSGVPTYADDF
KGRFAFSLETSASTAYLQINNFKNEDTATYFCARFSYGRHYFDYWGQGTALTASS
CDR3

Легкая цепь 14A1

CDR1 CDR2
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSYMNWYQKPGQPPKLLIYAASNLSGSI
PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQTDDPPWTFGGGKLEIK
CDR3
Фиг. 4C

Тяжелая цепь 2D5

CDR1 CDR2
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKDLKWMGWINTYSGVPTYTDDF
KGRFAFSLETSASTAFLQINNPKNEDTATYFCARFSYGRHYFDYWGQGTTLTVSS
CDR3

Легкая цепь 2D5

CDR1 CDR2
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSYMHYQKPGQPPKLLIYAASNLESIGI
PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQTNDPPWTFGGGKLEIK
CDR3
Фиг. 4D

Тяжелая цепь 53A11

CDR1 CDR2
EVQLQQSGPELLKPGASVKISCKASGYTFTDYMHWVKQSHGKSLWIGGINPYGGTTYNEKF
KDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAKGDYGGSYNYWGQGTTLTVSS
CDR3

Легкая цепь 53A11

CDR1 CDR2
DIVLTQSLATLSVTPGDSVSLSCRASQDISNSLHWYQKSHESPRLLIKYASQISIGIPSRF
SGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWPYTFGGGKLEIK
CDR3
Фиг. 4E

036324

Тяжелая цепь 13B3

CDR1 CDR2
EVQLQQSGPELLKPGASVKISCKASGYTFTEYTMHWVKQSHGKSLIEWIGSINPYGGTSYNEKF
KDKATLTVDKSSNTAYMEFRSLTSEDCAVYYCARYGNVYGYFDYWGQGTTLTVSS
CDR3

Легкая цепь 13B3

CDR1 CDR2
ENVLTQSPAIMASLGEKVTMSCRASSVHYMYWYQQKSDASPKLWIYYTSLNLAGVPPDRFS
GSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGGTKLEIK
CDR3

Фиг. 4F

Тяжелая цепь 23H8

CDR1 CDR2
EVQLQQSGPELLKPGASVKISCKASGYTFDNTIHWVKQSHGKSLIEWIGHINPYGGTNNNEKF
KDKATLTVDKSSNTAYMELRSLTSEDSAIYYCARKGIYYSSPFYWGQGTTLTVSS
CDR3

Легкая цепь 23H8

CDR1 CDR2
DIQMTQTSSLSASLGRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLISYTSKLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEREDFATYFCQQGNTLPFTFGSGTNLEIK
CDR3

Фиг. 4G

Тяжелая цепь 16B3

CDR1 CDR2
DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFSGYTMSWVRQTPEKRLELVAEISFARDRAFYPDTV
KGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCTR LGGRNHDYWFYFDVWGTGTTVTVSS
CDR3

Легкая цепь 16B3

CDR1 CDR2
DIVLTQSPTSLAVSPGQRATISCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQRPQLLIYAASNVESGV
PARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSWKVPFTFGSGTKLEIK
CDR3

Фиг. 4H

Тяжелая цепь 16E7

CDR1 CDR2
EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLELVAEISFTRSAFYPTV
KGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARLGNNYDYWFYFDVWGTGTTVTVSS
CDR3

Легкая цепь 16E7

CDR1 CDR2
DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQRPKLLIYAASNVESGV
PARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSWKVPFTFGSGTKLEIK
CDR3

Фиг. 4I

Тяжелая цепь 14E1

CDR1 CDR2

QVQLQQSGAELVKPGASVRLSCKASGYTFTKYTIHWVKQRSGQGLEWIGWFYPGSDSIKYNEKF
KDKATLTADKSSRTVYMELSRLTSEDSAVYFCARHEEYTNLAYWGQGLVTVSA

CDR3

Легкая цепь 14E1

CDR1 CDR2

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQQPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRF
 SGGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTLPWTFGGGTNLEIK

CDR3

Фиг. 4J

Тяжелая цепь 19E7

CDR1 CDR2

QVQLQQPGSVLVRPGASVRLSCKASGYTFTYWMHWVKQRPGQGLEWIGEIHYPYSGNNNNNEKF
KGKATLTVDTSSTAYVDLSRLTSEDSAVYYCARYDSNYVFAYWGQGLVTVSA

CDR3

Легкая цепь 19E7

CDR1 CDR2

QIVLTQSPAIMSASPGEGVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLIYSTSNLASGVPARFS
 GSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQRDSYLTFGSGTKLEVK

CDR3

Фиг. 4K

Тяжелая цепь 16F6

CDR1 CDR2

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTYWLAWVKQRPGHGLEWIGELIPGSAKTYNKKF
KGKATFTADTSSNTAYMQLSLTSSEDSAVYYCAVDYGDYWGQGSVTVSS

CDR3

Легкая цепь 16F6

CDR1 CDR2

DIVMTQSHKEMSTSVGDRVSITKASQDVYTAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRFTGVPDFR
 TGSGAGTEFTTINSVQAE~~DLAVYYCQ~~HYSIPRTFGGGKLEIK

CDR3

Фиг. 4L

55A1	1: QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF <u>TNYGMN</u> WVKQAPGKGLKMMGWINTYSGVPTY	60
7D4	1: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF <u>TNYGMN</u> WVKQAPGKDLKMMGWINTYSGVPTY	60
14A1	1: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF <u>TNYGMN</u> WVKQAPGKGLKMMGWINTYSGVPTY	60
2D5	1: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF <u>TNYGMN</u> WVKQAPGKGLKMMGWINTYSGVPTY	60
55A1	61: <u>AGDFKGRFAFS</u> LETSASTAYLQINNLKNE <u>DTATYFCARR</u> GYGRYFDYWGTTTVTVSS	120
7D4	61: <u>ADDFKGRFAFS</u> LETSASTAYLQINNLKNE <u>DTATYFCARF</u> SYGRHYFDYWGQTTTLTVSS	120
14A1	61: <u>ADDFKGRFAFS</u> LETSASTAYLQINNFKNE <u>DTATYFCARF</u> SYGRHYFDYWGQTALTASS	120
2D5	61: <u>TDDFKGRFAFS</u> LETSASTAFLQINNLKNE <u>DTATYFCARF</u> SYGRHYFDYWGQTTTLTVSS	120

Фиг. 5A

55A1	1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV <u>DYD</u> DSYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNLAS	60
7D4	1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV <u>DYD</u> GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLSG	60
14A1	1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV <u>DYD</u> GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLSK	60
2D5	1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV <u>DYD</u> GDSYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES	60
55A1	61: GIPARFSGGSGTDFTLNHPVEEEDVATYYCQ <u>QTI</u> EDPP- <u>TFGGG</u> TKLEIK	111
7D4	61: GIPARFSGGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC <u>HQ</u> STDDEPPWTFGGGKLEIK	112
14A1	61: GIPARFSGGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQ <u>QTI</u> DDEPPWTFGGGKLEIK	112
2D5	61: GIPARFSGGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQ <u>QTN</u> DDPPWTFGGGKLEIK	112

Фиг. 5B

036324

53A11 1:EVQLQQSGPELLKPGASVKISCKASGYTFTDYTMHWVKQSHGKSLEWIGGINPYGGTTY 60
 13B3 1:EVQLQQSGPELLKPGASVKISCKASGYTFTDYTMHWVKQSHGKSLEWIGSINPYGGTSY 60
 23H8 1:EVQLQQSGPELLKPGASVKISCKASGYTFTDNTLHWVKQSHGKSLEWIGHINPYGGTNN 60

53A11 61:NEKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAKGD-YYGGSYNYWGQGTTLTVSS 119
 13B3 61:NEKFKDKATLTVDKSSNTAYMEFRSLTSEDCAVYYCARYG-NYVGYFDYWGQGTTLTVSS 119
 23H8 61:NEKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSATYYCARKGIYYSSPFDYWGQGTTLTVSS 120

Фиг. 5C

53A11 1:DIVLTQSLATLSVTPGDSVLSCRASQDISNSLHWYQKSHESPRLLIKYASQSIGGPS 60
 13B3 1:ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSV-HYMYWYQKSDASPKLWIYYTSLNLAGVDP 59
 23H8 1:DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQKPDGTVKLLIYTSKLSHGVPS 60

53A11 61:RFSGSGSGTDFTLINSVETEDFGMYFCQSSNSWPFYTFGGGKLEIK 107
 13B3 60:RFSGSGSGNSYSLTISMEGEDAATYYCQQTSSPFYTFGGGKLEIK 106
 23H8 61:RFSGSGSGTDYSLTISNLEREDFATYFCQGNLTFPFTFGSGTNLEIK 107

Фиг. 5D

16B3 1:DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFSGYTMSSWVRQTPEKRLELVAEISFARDRAFY 60
 16E7 1:EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSSWVRQTPEKRLELVAEISFTRSAFY 60

16B3 61:PDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCTRLGGRNHDYWFYFDVWGTGTTVTV 120
 16E7 61:PDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARLGGNNYDYWFYFDVWGTGTTVTV 120

16B3 121:SS 122
 16E7 121:SS 122

Фиг. 6A

16B3 1:DIVLTQSPTS LAVSPGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYQKPGQRPQLLIYAASNVES 60
 16E7 1:DIVLTQSPTS LAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYQKPGQRPKLLIYAASNVES 60

16B3 61:GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQSSWKVPFTFGSGTKLEIK 111
 16E7 61:GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQSSWKVPFTFGSGTKLEIK 111

Фиг. 6B

14E1 1:QVQLQQSGAELVKPGASVRLSCKASGYTFTKYTIHWVKQRSGQGLEWIGWFYPGSDSIKY 60
 19E7 1:QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGEIHYPYSGNNNN 60

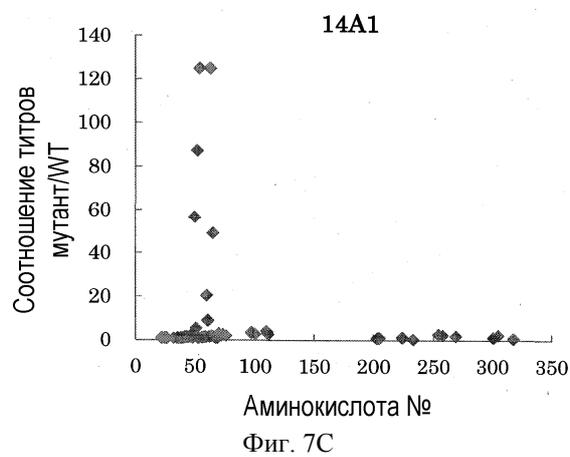
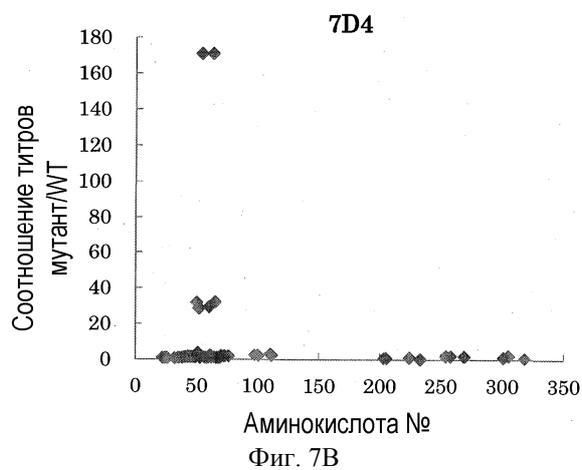
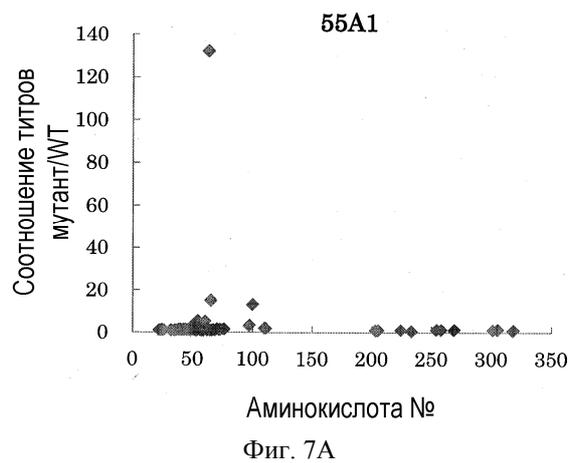
14E1 61:NEKFKDKATLTVADKSSRTVYMELSRLTSEDSAVYFCARHEEYTNLAYWGQGTTLTVSA 119
 19E7 61:NEKFKDKATLTVDTSSSTAYVDLSRLTSEDSAVYYCARYDS-NYVFAYWGQGTTLTVSA 118

Фиг. 6C

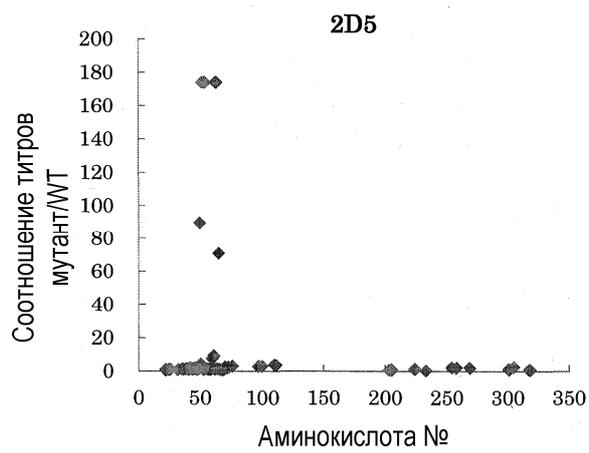
14E1 1:DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQPDGTVKLLIYYTSLRLHSGVPS 60
 19E7 1:QIVLTQSPAIMSASPGEGVTITCSASSSVS-YMHWYQKPGTSPKLIYSTSNLAGVPA 59

14E1 61:RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTLFPWTFGGGTNLEIK 107
 19E7 60:RFSGSGSGTSYSLTISRMEADAATYYCQQRDSY-LTFGSGTKLEVK 105

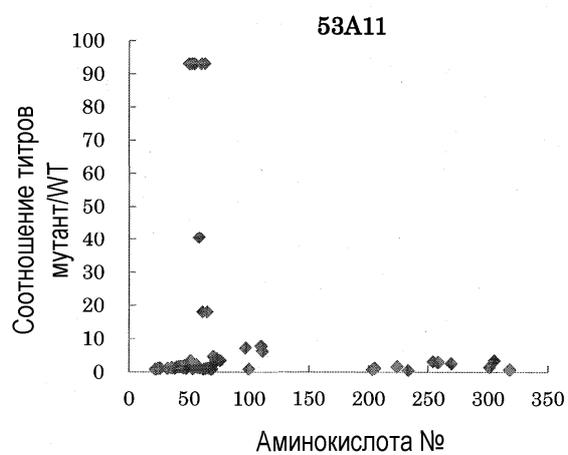
Фиг. 6D



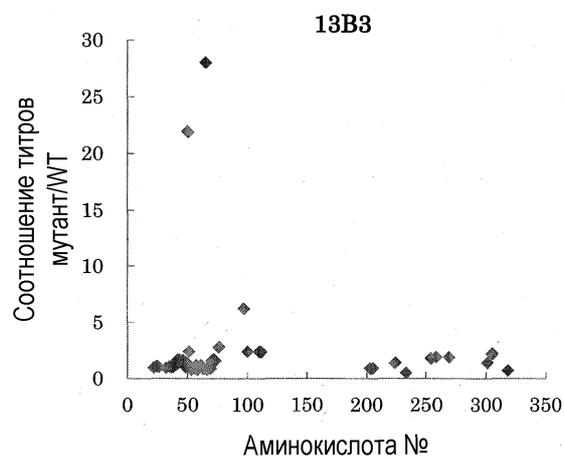
036324



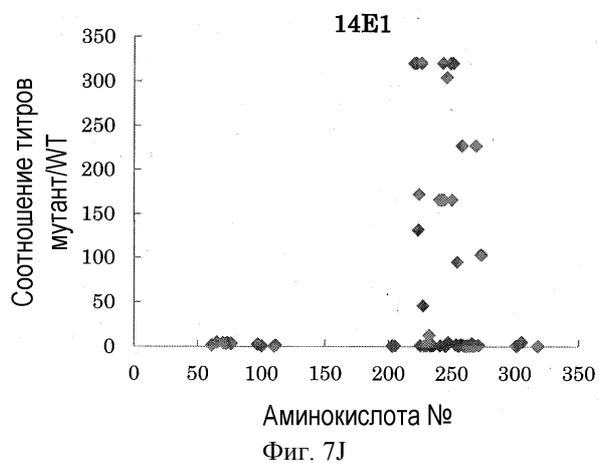
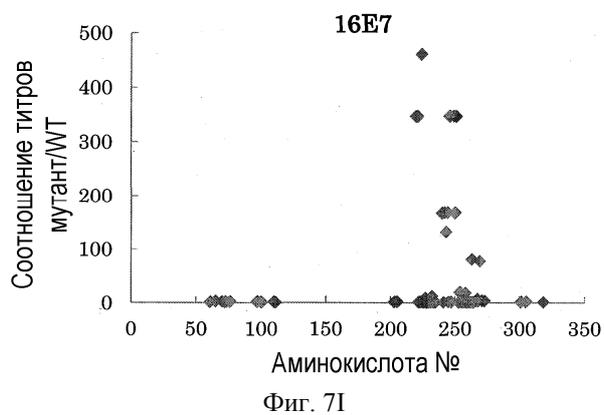
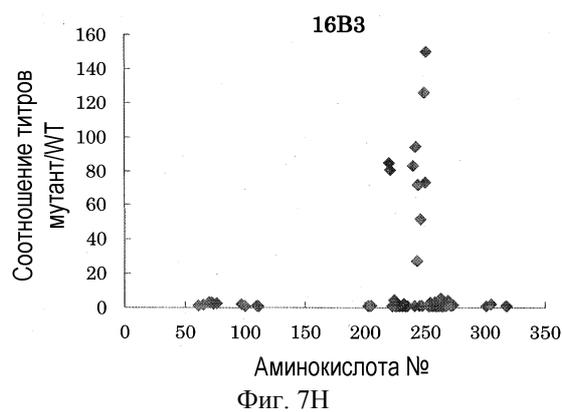
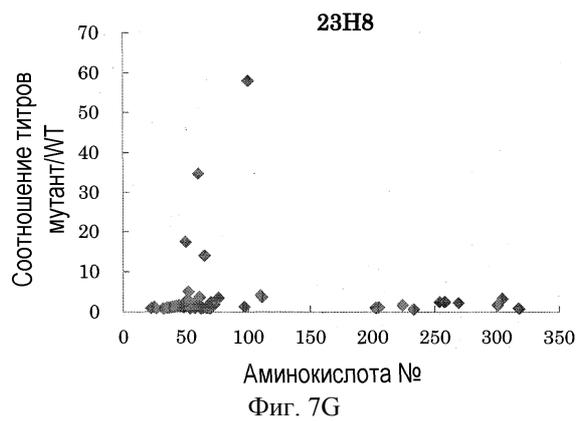
Фиг. 7D

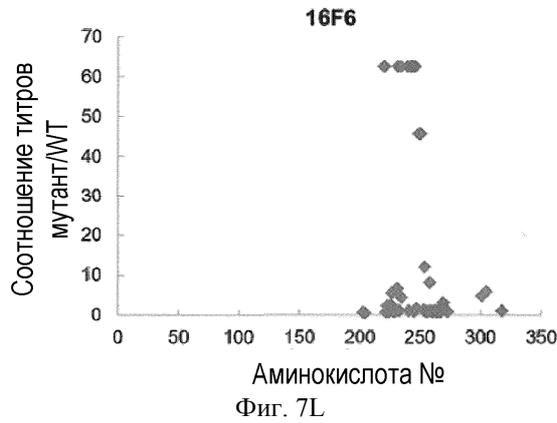
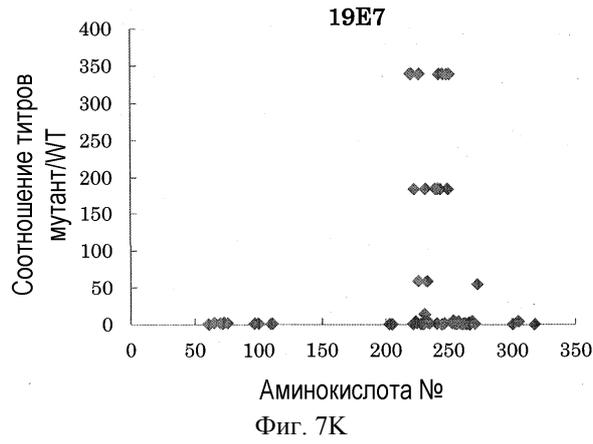


Фиг. 7E



Фиг. 7F





Тяжелая цепь h16B3

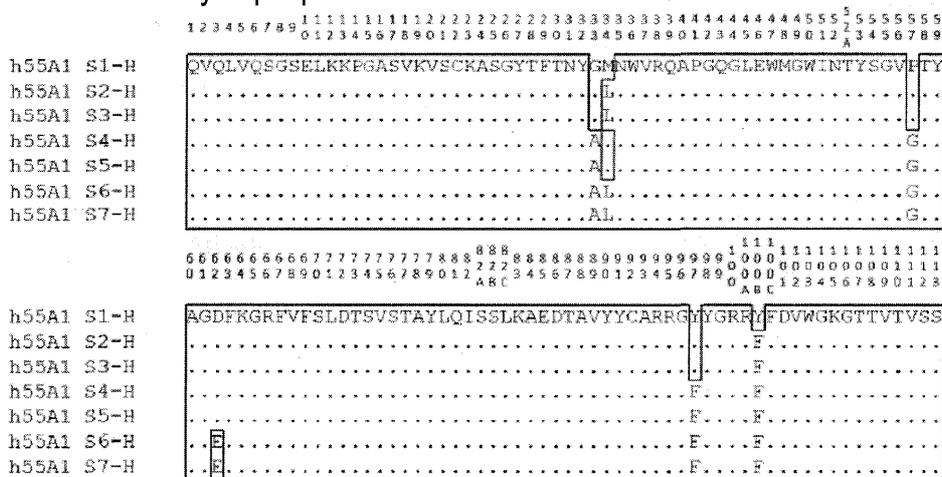
Нумерация по Kabat

	1111111111112222222222333333333344444444445555555555
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
h16B3 S1-H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFSGYTMHWVRQAPGKGLWVSEISFARDRAFY
h16B3 S2-H
h16B3 S3-H
h16B3 S4-H
h16B3 S5-H
h16B3 S6-H
h16B3 S7-H
h16B3 S8-H
	66666666667777777777888888888899999999991111111111111111
	0123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
h16B3 S1-H	PDIVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKLGGRNFDIYFDWVQGGTIVTV
h16B3 S2-HR...K...F.....
h16B3 S3-HR...K...F.....
h16B3 S4-HR...K...F.....
h16B3 S5-HR...K...F.....
h16B3 S6-HR...K...F.....
h16B3 S7-HR...K...F.....
h16B3 S8-HR...K...F.....
	11
	11
	23
h16B3 S1-H	SS
h16B3 S2-H	..
h16B3 S3-H	..
h16B3 S4-H	..
h16B3 S5-H	..
h16B3 S6-H	..
h16B3 S7-H	..
h16B3 S8-H	..

Фиг. 8А

Тяжелая цепь h55A1

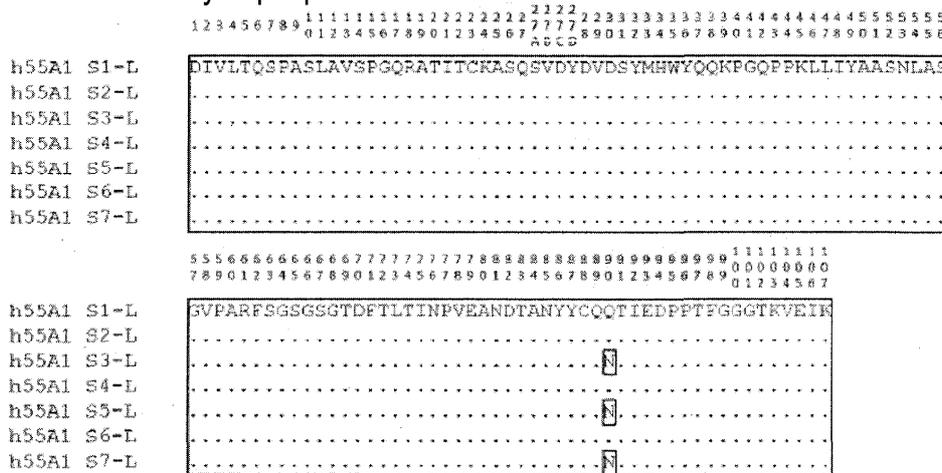
Нумерация по Kabat



Фиг. 9A

Легкая цепь h55A1

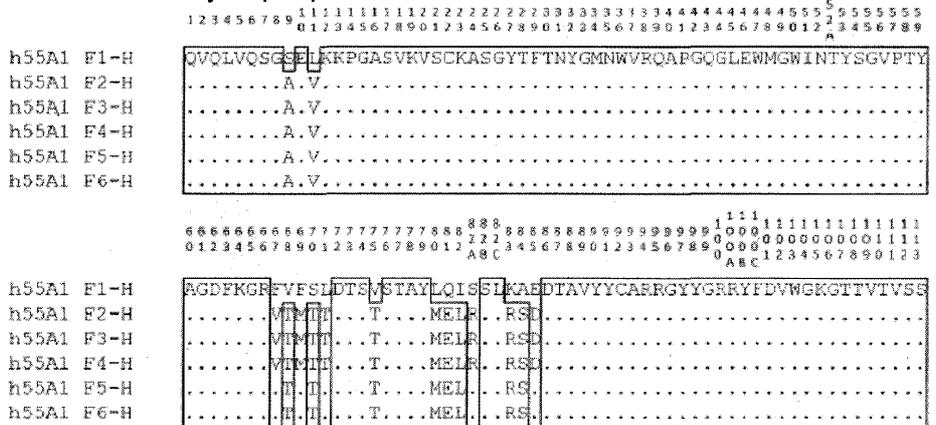
Нумерация по Kabat



Фиг. 9B

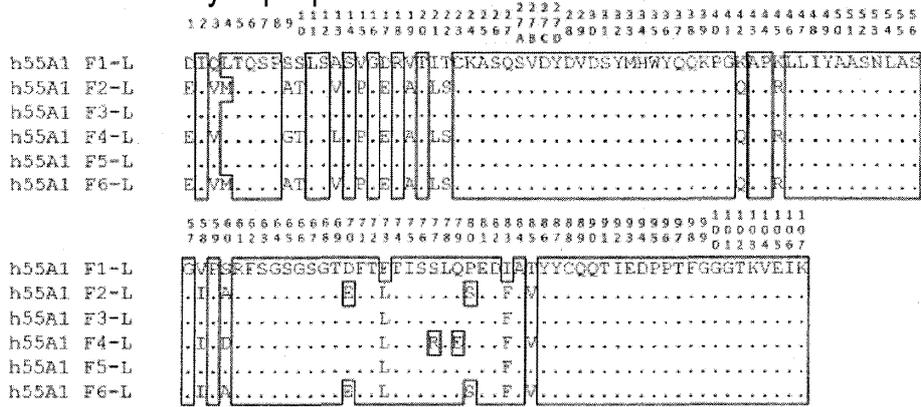
Тяжелая цепь h55A1

Нумерация по Kabat



Фиг. 9C

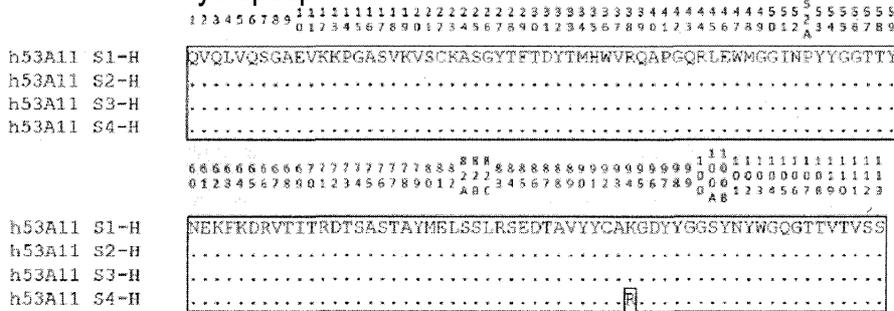
Легкая цепь h55A1
Нумерация по Kabat



Фиг. 9D

Тяжелая цепь h53A11

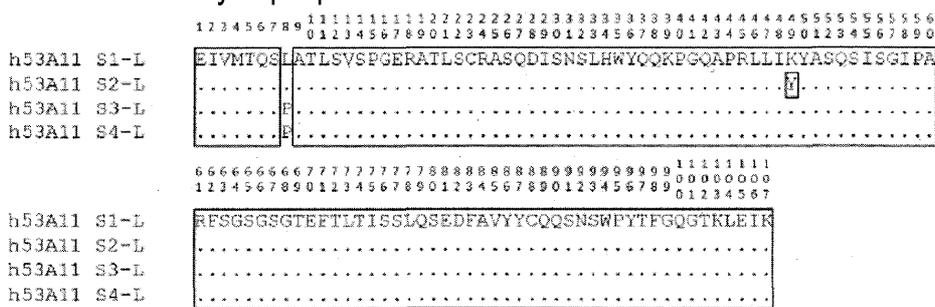
Нумерация по Kabat



Фиг. 10A

Легкая цепь h53A11

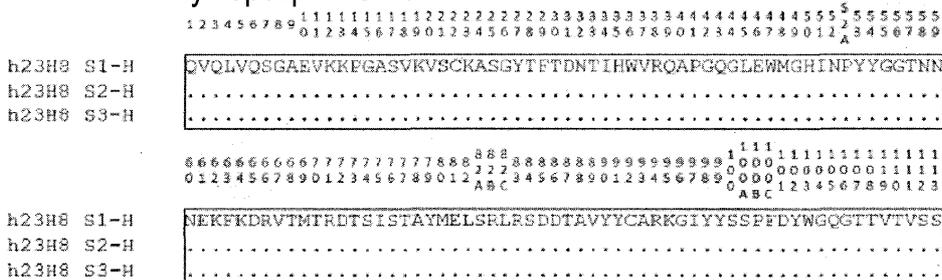
Нумерация по Kabat



Фиг. 10B

Тяжелая цепь h23H8

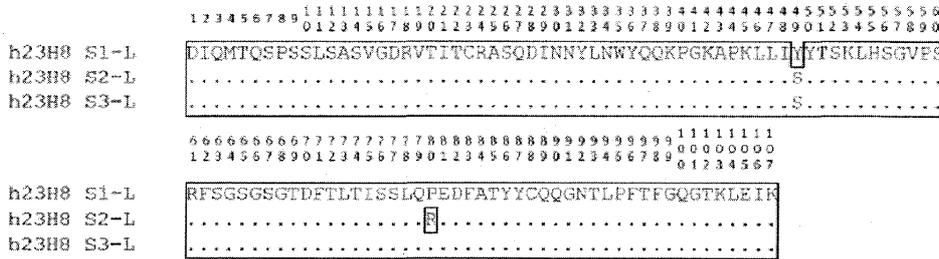
Нумерация по Kabat



Фиг. 11A

Легкая цепь h23H8

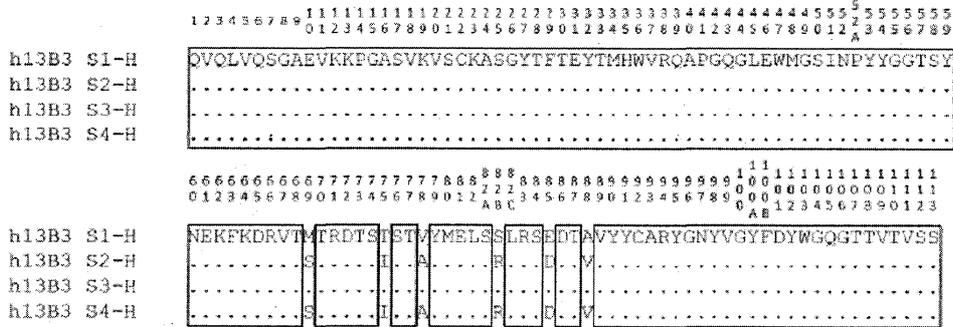
Нумерация по Kabat



Фиг. 11B

Тяжелая цепь h13B3

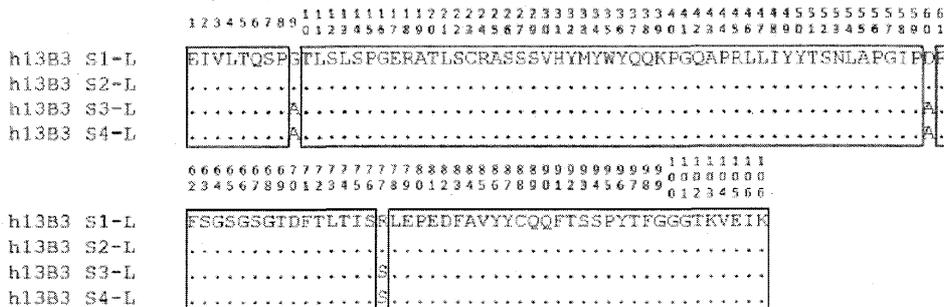
Нумерация по Kabat



Фиг. 12A

Легкая цепь h13B3

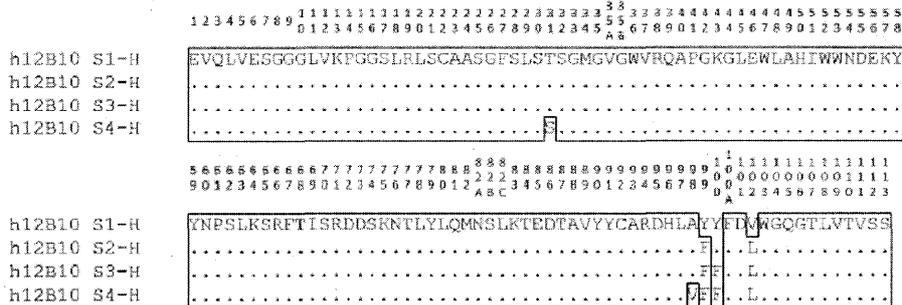
Нумерация по Kabat



Фиг. 12B

Тяжелая цепь h12B10

Нумерация по Kabat



Фиг. 13A

Легкая цепь h12B10

Нумерация по Kabat

123456789 111111111122222222223333333333444444444455555555556
01234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

h12B10 S1-L DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLMAYPFTLQPGVPS
h12B10 S2-L
h12B10 S3-L
h12B10 S4-L

6666666666777777777788888888889999999999 11111111
1234567890123456789012345678901234567890 90000000
01234567 01234567

h12B10 S1-L RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYDNLWTFGGGTKVEIK
h12B10 S2-L
h12B10 S3-L
h12B10 S4-L

Фиг. 13B

Тяжелая цепь h16F6

Нумерация по Kabat

123456789 111111111122222222223333333333444444444455555555556
01234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

h16F6 S1-H QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTYWIAWVRQARGQGLEWMGELLPGSAKTKY
h16F6 S2-H
h16F6 S3-H
h16F6 S4-H
h16F6 S5-H

6666666666777777777788888888889999999999 11111111111111
01234567890123456789012345678901234567890 00000000001111
01234567 2222345678901234567890 0234567890123

h16F6 S1-H NKRKFKGRVTMRDTSSTVYMELSLRSEDTAVYYCAVYDYGADYWGQGTITVTVSS
h16F6 S2-H
h16F6 S3-H
h16F6 S4-H
h16F6 S5-H

Фиг. 14A

Легкая цепь h16F6

Нумерация по Kabat

123456789 111111111122222222223333333333444444444455555555556
01234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

h16F6 S1-L DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASYRFTGVPS
h16F6 S2-L
h16F6 S3-L
h16F6 S4-L
h16F6 S5-LS.....

6666666666777777777788888888889999999999 1111111111
12345678901234567890123456789012345678901234567890 00000000
01234567 01234567

h16F6 S1-L RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYSIPRTFGGGTKVEIK
h16F6 S2-L ..A.....
h16F6 S3-L ..T...A.....
h16F6 S4-L ..T...A.....S.....
h16F6 S5-L ..T...A.....S.....

Фиг. 14B

Тяжелая цепь h16B3-S1

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLGGRNHDYWFYFDVWGQGTTVTSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S1

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQSWKVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15A

Тяжелая цепь h16B3-S2

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGRNHDYWFYFDVWGQGTTVTSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S2

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQSWKVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15B

Тяжелая цепь h16B3-S3

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGKNHDFWYFDVWGQGTTVTSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S3

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQSWKVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15C

Тяжелая цепь h16B3-S4

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGKNHDFWYFDVWGQGTTVTSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S4

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQSWRVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15D

Тяжелая цепь h16B3-S5

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGKNRDFWYFDLWGQGT TTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S5

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQSWKVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15E

Тяжелая цепь h16B3-S6

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGKNRDFWYFDLWGQGT TTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S6

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQSWRVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15F

Тяжелая цепь h16B3-S7

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYTMSWVRQAPGKGLEWVSDISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGKNRDFWYFDLWGQGT TTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S7

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQSWKVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15G

Тяжелая цепь h16B3-S8

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYTMSWVRQAPGKGLEWVSDISFARDRAFYPDTVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGKNRDFWYFDLWGQGT TTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16B3-S8

CDR1 CDR2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQSWRVPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15H

Тяжелая цепь h16B3-F1

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTM^{SWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFY}PDTVKG
 RFTISRDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCARLGGRNHDYWF^{FDVWGQGT}TVT^{VSS}
 CDR3

Легкая цепь h16B3-F1

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASESVEYYGTS^{LMQWYQKPKGKAPKLLIYAASN}VESGVP^{SRFS}
 GSGSGTDF^{TLTISSLQPEDFATYYCQ}QSWKVP^{FTFGQ}GTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15I

Тяжелая цепь h16B3-F2

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTM^{SWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFY}PDTVKG
 RFTISRDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCARLGGRNHDYWF^{FDVWGQGT}TVT^{VSS}
 CDR3

Легкая цепь h16B3-F2

CDR1 CDR2
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVEYYGTS^{LMQWYQKPGQAPRLLIYAASN}VESGIP^{ARFS}
 GSGSGTEF^{TLTISSLQSEDFAVYYCQ}QSWKVP^{FTFGQ}GTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15J

Тяжелая цепь h16B3-F3

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYTM^{SWVRQAPGKGLEWVSEISFARDRAFY}PDTVKG
 RFTISRDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCARLGGRNHDYWF^{FDVWGQGT}TVT^{VSS}
 CDR3

Легкая цепь h16B3-F3

CDR1 CDR2
 EIVLTQSPGTL^{SLSPGERATL}SCRASESVEYYGTS^{LMQWYQKPGQAPRLLIYAASN}VESGIP^{DRFS}
 GSGSGTDF^{TLTISRLEPEDFAVYYCQ}QSWKVP^{FTFGQ}GTKLEIK
 CDR3

Фиг. 15K

Тяжелая цепь h55A1-S1

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCKASGYTFTNYGMN^{WVRQAPGQGLEW}MGWINTYSGVPT^{YAGDF}FKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGYYGR^{RYFDVWGKGT}TVT^{VSS}
 CDR3

Легкая цепь h55A1-S1

CDR1 CDR2
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCKASQSDYD^{VDSYMHWYQKPGQPPKLLIYAASN}LAGV^{PARFS}
 GSGSGTDF^{TLTINPVEANDTANYYCQQTIEDPPT}FGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16A

Тяжелая цепь h55A1-S2

CDR1
CDR2
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLN**WVRQAPGGLEWMGW**INTYSGVPTYAGDFKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRG**YYGR**FFDVWGKGTTVTSS
CDR3

Легкая цепь h55A1-S2

CDR1
CDR2
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCKASQSDYD**VD**SYMH**WYQKPGQPPKLLIYAASN**LASGVPARFS
 GSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC**QQTIE**DPPTFGGGTKVEIK
CDR3

Фиг. 16B

Тяжелая цепь h55A1-S3

CDR1
CDR2
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLN**WVRQAPGGLEWMGW**INTYSGVPTYAGDFKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRG**YYGR**FFDVWGKGTTVTSS
CDR3

Легкая цепь h55A1-S3

CDR1
CDR2
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCKASQSDYD**VD**SYMH**WYQKPGQPPKLLIYAASN**LASGVPARFS
 GSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC**QNTIE**DPPTFGGGTKVEIK
CDR3

Фиг. 16C

Тяжелая цепь h55A1-S4

CDR1
CDR2
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNY**AMN**WVRQAPGGLEWMGW**INTYSGV**GTYAGDFKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRG**FYGR**FFDVWGKGTTVTSS
CDR3

Легкая цепь h55A1-S4

CDR1
CDR2
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCKASQSDYD**VD**SYMH**WYQKPGQPPKLLIYAASN**LASGVPARFS
 GSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC**QQTIE**DPPTFGGGTKVEIK
CDR3

Фиг. 16D

Тяжелая цепь h55A1-S5

CDR1
CDR2
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNY**AMN**WVRQAPGGLEWMGW**INTYSGV**GTYAGDFKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRG**FYGR**FFDVWGKGTTVTSS
CDR3

Легкая цепь h55A1-S5

CDR1
CDR2
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCKASQSDYD**VD**SYMH**WYQKPGQPPKLLIYAASN**LASGVPARFS
 GSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC**QNTIE**DPPTFGGGTKVEIK
CDR3

Фиг. 16E

Тяжелая цепь h55A1-S6

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYALNWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVGTYAGEFKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGFYGRFFDVWGKGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-S6

CDR1 CDR2
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCKASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNLAGVPARFS
 GSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQQTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16F

Тяжелая цепь h55A1-S7

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYALNWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVGTYAGEFKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGFYGRFFDVWGKGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-S7

CDR1 CDR2
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCKASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNLAGVPARFS
 GSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQNTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16G

Тяжелая цепь h55A1-F1

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAGDFKG
 RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGYGRYFDVWGKGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-F1

CDR1 CDR2
 DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPGKAPKLLIYAASNLAGVPSRFS
 GSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16H

Тяжелая цепь h55A1-F2

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAGDFKG
 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRGYGRYFDVWGKGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-F2

CDR1 CDR2
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPGQAPRLLIYAASNLAGI PARFS
 GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16I

Тяжелая цепь h55A1-F3

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAGDFKG
 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRGYIGRRYFDVWGKGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-F3

CDR1 CDR2
 DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPKGKAPKLLIYAASNLAGVPSRFS
 GSGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16J

Тяжелая цепь h55A1-F4

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAGDFKG
 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRGYIGRRYFDVWGKGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-F4

CDR1 CDR2
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCKASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPGQAPRLLIYAASNLAGIPIRFS
 GSGSGTDFLLTISRLEPEDFAVYYCQQTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16K

Тяжелая цепь h55A1-F5

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAGDFKG
 RFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGYIGRRYFDVWGKGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-F5

CDR1 CDR2
 DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPKGKAPKLLIYAASNLAGVPSRFS
 GSGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16L

Тяжелая цепь h55A1-F6

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAGDFKG
 RFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGYIGRRYFDVWGKGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h55A1-F6

CDR1 CDR2
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVVDYDVDSYMHWYQQKPGQAPRLLIYAASNLAGIPIRFS
 GSGSGTEFTLLTISLQSEDFAVYYCQQTIEDPPTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 16M

Тяжелая цепь h53A11-s1

CDR1 CDR2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYTMHWVRQAPGQRLEWMGGINPYGGTTYNEKFKD
 RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGDYGGSYNYWGQGTTVTVSS

CDR3

Легкая цепь h53A11-s1

CDR1 CDR2

EIVMTQSLATLSVSPGERATLSCRASQDISNSLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGS
 GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQSNSWPYTFGQGTKLEIK

CDR3

Фиг. 17A

Тяжелая цепь h53A11-s2

CDR1 CDR2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYTMHWVRQAPGQRLEWMGGINPYGGTTYNEKFKD
 RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGDYGGSYNYWGQGTTVTVSS

CDR3

Легкая цепь h53A11-s2

CDR1 CDR2

EIVMTQSLATLSVSPGERATLSCRASQDISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSIGIPARFSGSGS
 GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQSNSWPYTFGQGTKLEIK

CDR3

Фиг. 17B

Тяжелая цепь h53A11-s3

CDR1 CDR2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYTMHWVRQAPGQRLEWMGGINPYGGTTYNEKFKD
 RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGDYGGSYNYWGQGTTVTVSS

CDR3

Легкая цепь h53A11-s3

CDR1 CDR2

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQDISNSLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGS
 GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQSNSWPYTFGQGTKLEIK

CDR3

Фиг. 17C

Тяжелая цепь h53A11-s4

CDR1 CDR2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYTMHWVRQAPGQRLEWMGGINPYGGTTYNEKFKD
 RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDYGGSYNYWGQGTTVTVSS

CDR3

Легкая цепь h53A11-s4

CDR1 CDR2

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQDISNSLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGS
 GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQSNSWPYTFGQGTKLEIK

CDR3

Фиг. 17D

Тяжелая цепь h23H8-S1

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDNTIHWVRQAPGQGLEWMGHINPYGGTNNNEKFKD
 RVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARKGIYYSSPFDYWGQGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h23H8-S1

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLSHSGVPSRFRSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 18А

Тяжелая цепь h23H8-S2

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDNTIHWVRQAPGQGLEWMGHINPYGGTNNNEKFKD
 RVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARKGIYYSSPFDYWGQGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h23H8-S2

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLISYTSKLSHSGVPSRFRSGSGS
 GTDFTLTISLQREDFATYYCQQGNTLPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 18В

Тяжелая цепь h23H8-S3

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDNTIHWVRQAPGQGLEWMGHINPYGGTNNNEKFKD
 RVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARKGIYYSSPFDYWGQGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h23H8-S3

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLISYTSKLSHSGVPSRFRSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPFTFGQGTKLEIK
 CDR3

Фиг. 18С

Тяжелая цепь h13B3-S1

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGSINPYGGTSYNEKFKD
 RVTMTRDTSISTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYGNVGYFDYWGQGTITVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h13B3-S1

CDR1 CDR2
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVHYMYWYQQKPGQAPRLLIYYTSNLAGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFTSSPYTFGGGTKEIK
 CDR3

Фиг. 19А

Тяжелая цепь h13B3-S2

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGSINPYGGTSYNEKFKD
 RVTSTRDTSISTAYMELSLRLSDDTVVYYCARYGNYVGYFDYWGQGT^UTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h13B3-S2

CDR1 CDR2
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASSSVHYMYWYQQKPGQAPRLLIYYTSNLAPGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFTSSPYTFGGGKVEIK
 CDR3

Фиг. 19B

Тяжелая цепь h13B3-S3

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGSINPYGGTSYNEKFKD
 RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARYGNYVGYFDYWGQGT^UTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h13B3-S3

CDR1 CDR2
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVHYMYWYQQKPGQAPRLLIYYTSNLAPGIPARFSGSGSG
 TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFTSSPYTFGGGKVEIK
 CDR3

Фиг. 19C

Тяжелая цепь h13B3-S4

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGSINPYGGTSYNEKFKD
 RVTSTRDTSISTAYMELSLRLSDDTVVYYCARYGNYVGYFDYWGQGT^UTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h13B3-S4

CDR1 CDR2
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVHYMYWYQQKPGQAPRLLIYYTSNLAPGIPARFSGSGSG
 TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFTSSPYTFGGGKVEIK
 CDR3

Фиг. 19D

Тяжелая цепь h12B10-S1

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFSLSSTSGMGVGVWRQAPGKLEWLAHIWVNDKYYNPSLKS
 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDHLAYYFDVWGQGT^ULTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h12B10-S1

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLMAYPFTLQPGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLPEDFATYYCLQYDNL^ULWTFGGKVEIK
 CDR3

Фиг. 20A

Тяжелая цепь h12B10-S2

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS**CAASGFSLSTSGMGVGVWRQAPGKGLEWLAHIW**WNDEKYYNPSLKS
 RFTISRDDSKNTLYLQMN**SLKTEDTAVYYCARDHLAFYFDLWGQ**GLVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h12B10-S2

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASV**GD**RVTTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLMAY**PFTLQ**PGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTIS**SLQ**PEDFATYYC**LQYD**NLLWTFGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 20B

Тяжелая цепь h12B10-S3

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS**CAASGFSLSTSGMGVGVWRQAPGKGLEWLAHIW**WNDEKYYNPSLKS
 RFTISRDDSKNTLYLQMN**SLKTEDTAVYYCARDHLAFFDLWGQ**GLVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h12B10-S3

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASV**GD**RVTTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLMAY**PFTLQ**PGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTIS**SLQ**PEDFATYYC**LQYD**NLLWTFGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 20C

Тяжелая цепь h12B10-S4

CDR1 CDR2
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS**CAASGFSLSSSGMGVGVWRQAPGKGLEWLAHIW**WNDEKYYNPSLKS
 RFTISRDDSKNTLYLQMN**SLKTEDTAVYYCARDHLVFFDLWGQ**GLVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h12B10-S4

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASV**GD**RVTTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLMAY**PFTLQ**PGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTIS**SLQ**PEDFATYYC**LQYD**NLLWTFGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 20D

Тяжелая цепь h16F6-S1

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV**SCKASGYTFTTYWIAWVRQAPGQGLEWMGEILPGS**AKTKYK**KKFKG**
 RVTMTRDTSTSTVY**MELSSLRSEDTAVYYCAVYDYGADYWGQ**TTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16F6-S1

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASV**GD**RVTTITCKASQDVYTA**VAWYQQKPGKSPKLLIYSAS**YRFTGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTIS**SLQ**PEDFATYYC**QQHYSIPRTFGG**GTKVEIK
 CDR3

Фиг. 21A

Тяжелая цепь h16F6-S2

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWIAWVRQAPGGLEWMGEILPGSAKTKYNKFKG
 RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAVDYDYGADYWGQGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16F6-S2

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGDVRVTITCKASQDVYTAVAWYQQKPKGSPKLLIYSASRYFTGVPSRFTGSGA
 GTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYSIPRTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 21B

Тяжелая цепь h16F6-S3

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWIAWVRQAPGGLEWMGEILPGSAKTKYNKFKG
 RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAVDYDYGADYWGQGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16F6-S3

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGDVRVTITCKASQDVYTAVAWYQQKPKGSPKLLIYSASRYFTGVPSRFTGSGA
 GTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYSIPRTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 21C

Тяжелая цепь h16F6-S4

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWIAWVRQAPGGLEWMGEILPGSAKTKYNKFKG
 RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAVDYDYGADYWGQGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16F6-S4

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGDVRVTITCKASQDVYTAVAWYQQKPKGSPKLLIYSASRYFTGVPSRFTGSGA
 GTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYSIPRTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 21D

Тяжелая цепь h16F6-S5

CDR1 CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWIAWVRQAPGGLEWMGEILPGSAKTKYNKFKG
 RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAVDYDYGADYWGQGTTVTVSS
 CDR3

Легкая цепь h16F6-S5

CDR1 CDR2
 DIQMTQSPSSLSASVGDVRSITCKASQDVYTAVAWYQQKPKGSPKLLIYSASRYFTGVPSRFTGSGA
 GTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYSIPRTFGGGTKVEIK
 CDR3

Фиг. 21E



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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