



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.23**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201492162**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.05.24**

**(54) АНТИТЕЛА К ТРАНСГЛЮТАМИНАЗЕ 2**

**(31)** 1209096.5

**(32)** 2012.05.24

**(33)** GB

**(43)** 2015.03.31

**(86)** PCT/GB2013/051373

**(87)** WO 2013/175229 2013.11.28

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**МЕДИКАЛ РИСЕЧ КАУНСЭЛ  
ТЕКНОЛОДЖИ (GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Джонсон Тим, Уотсон Фил, Мэтьюс  
Дэвид, Браун Алекс (GB)**

**(74)** Представитель:  
**Осипов К.В., Рыбаков В.М., Липатова  
И.И., Новоселова С.В., Дощечкина  
В.В., Хмара М.В., Пантелеев А.С.,  
Ильмер Е.Г. (RU)**

**(56)** N.N.: "Anti-transglutaminase 2 antibody [CUB 7402] (ab2386), Abcam-Data sheet, 2010, XP002711958, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.abcam.com/transglutaminase-2-antibody-cub-7402-ab2386.html> [retrieved on 2013-08-27] page 1

T.-S. LAI ET AL.: "Identification of two GTP-independent alternatively spliced forms of tissue transglutaminase in human leukocytes, vascular smooth muscle, and endothelial cells", THE

FASEB JOURNAL, vol. 21, no. 14, 20 July 2007 (2007-07-20), pages 4131-4143, XP055076665, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.06-7598com, figure 2 & Thung-S. Lai ET AL.: "Supplemental data.", FASEB Journal, 20 July 2007 (2007-07-20), pages 1-6, XP055076991, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.fasebj.org/content/suppl/2007/07/31/fj.06-7598com.DC1/06-7598SupplementalData.pdf> [retrieved on 2013-08-29] figure S2

WO-A2-2010113025

WO-A2-02068616

ROBERTO DI NIRO ET AL.: "Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 388, no. 3, 15 June 2005 (2005-06-15), pages 889-894, XP055076637, ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/BJ20041983, page 892; table 1

WO-A2-2006100679

DI NIRO ROBERTO ET AL.: "Construction of mini antibodies for the in vivo study of human autoimmune diseases in animal models", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 7, no. 1, 1 August 2007 (2007-08-01), page 46, XP021029486, ISSN: 1472-6750, DOI: 10.1186/1472-6750-7-46, figure 5

CACCAMO DANIELA ET AL.: "Potential of transglutaminase 2 as a therapeutic target", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, vol. 14, no. 9, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 989-1003, XP009172074, ISSN: 1744-7631, DOI: 10.1517/14728222.2010.510134, the whole document

**(57)** В изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, селективно связывающиеся с эпитопом, находящимся внутри центрального участка трансглутаминазы типа 2 (TG2). Предложены новые эпитопы внутри центрального участка TG2. В изобретении предложены ингибиторные антитела к TG2 человека и их применения, в частности, в медицине, например, при лечении и/или диагностике состояний, включающих целиакию, рубцевание, заболевания, относящиеся к фиброзам, нейродегенеративные/неврологические заболевания и рак.

Настоящее изобретение относится к ингибиторам TG2 и к способам получения и применения таких ингибиторов.

Трансглютаминаза типа 2 (TG2; от англ. "Transglutaminase type 2", также известная как тканевая трансглютаминаза, tG) составляет часть более обширного 9-членного семейства трансглютаминаз, включающего Фактор XIIIa, являющийся критическим для свертывания крови, а также трансглютаминазу кератиноцитов (TG1) и эпидермальную трансглютаминазу (TG3), которые вовлечены в окончательную дифференцировку кератиноцита. Кроме того, существуют другие члены семейства TG, такие как TG типов 4-7, определяющая роль которых до настоящего времени не идентифицирована.

TG2 функционирует, прежде всего, как фермент, образующий поперечные сшивки белков посредством катализа образования  $\epsilon$ ( $\gamma$ -глутамил)лизин-изодипептидных связей. Повышенная экспрессия TG2 ведет к aberrантному поперечному сшиванию белков, которые ассоциированы с несколькими патологиями, включающими различные типы рубцевания ткани, образование нейрофибриллярных клубков при нескольких расстройствах головного мозга и резистентности к химиотерапии при некоторых видах рака. TG2 также способна к деамидированию белков. TG2 деамидирует глиадин, и комплекс TG2/глиадин является первичным аутоантигеном при целиакии. Кроме того, TG2 обладает ГТФ-связывающей функцией и может действовать как ГТФаза, хотя это не связано с ее патологической ролью.

Повышенная активность TG2, прежде всего, связана с аномальным заживлением раны [1], приводящим к фиброзу печени [2], легких [3], сердца [4] и почки [5], а также к атеросклерозу [6]. Процесс рубцевания и фиброз связан с повышенным синтезом и, что наиболее важно, с повышенным экспортом TG2 в интерстициальное пространство. Находясь вне клетки, TG2 способна вызывать поперечные сшивки белков внеклеточного матрикса (ВКМ), такие как фибронектин и коллаген [7], путем включения  $\epsilon$ ( $\gamma$ -глутамил)лизин-изодипептидной связи [8]. Исследования показали, что это может ускорить депонирование доступных компонентов ВКМ, в то же время придавая устойчивость к протеолитическому клиренсу системой матриксных металлопротеиназ (ММР; от англ. "matrix metalloproteinase") [9, 10]. Все это, вместе взятое, вызывает накопление белков ВКМ и, следовательно, рубцовой ткани [9]. Кроме того, TG2 играет усиливающую роль в активации латентного трансформирующего фактора роста (TGF-P1; от англ. "Transforming Growth Factor") в процессе рубцевания [11], а также сопряжена с биохимическими путями активации интерлейкина-6 [12] и фактора некроза опухоли  $\alpha$  [13].

Ингибирование TG2 *in vitro* снижает уровни внеклеточного матрикса [14], тогда как клетки, выделенные из трансгенных нокаут-мышей по TG2, имеют более низкие уровни зрелого ВКМ [9]. Применение *in vivo* универсальных ингибиторов TG в моделях хронического заболевания почек уменьшает развитие гломерулосклероза и тубулоинтерстициального фиброза, предохраняя функцию почек [15, 16]. Подобные полезные эффекты наблюдают у нокаут-мышей по TG2, подвергнутых односторонней обструкции мочеточников [17].

Существует несколько нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся присутствием в дегенеративной области головного мозга белковых агрегатов, в образовании которых участвует TG2. Лучшее всего охарактеризована хорея Гентингтона. Белок Гентингтона (htt; от англ. "Huntington protein") содержит экспансию полиглутаминовых повторов в его N-концевом домене. Белок htt дикого типа содержит менее 35 последовательных глутаминов, тогда как htt, связанный с заболеванием, в характерном случае имеет более 40 последовательных глутаминов, что делает его великолепным субстратом для TG2. Вследствие этого в стриатуме и коре головного мозга пациентов с болезнью Гентингтона образуются нерастворимые агрегаты. Частота агрегатов хорошо согласуется с тяжестью заболевания.

Болезнь Альцгеймера характеризуется присутствием внеклеточных сенильных бляшек, состоящих из агрегированного амилоидного  $\beta$ -белка и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, состоящих из высоко фосфорилированной формы белка tau. Эти бляшки содержат большие количества  $\epsilon$ ( $\gamma$ -глутамил)-лизин-изодипептидных связей.

Наконец, отличительным признаком болезни Паркинсона является присутствие в цитоплазме пораженных нейронов агрегатов альфа-синуклеина, называемых тельцами Леви, которые, опять же, содержат  $\epsilon$ ( $\gamma$ -глутамил)-лизин-изодипептидные связи. Все упомянутые выше белки являются хорошими субстратами для TG2 *in vitro*. Кроме того, пораженная область головного мозга содержит более высокие уровни белка TG2, чем непораженные области головного мозга у тех же пациентов. Корреляция между субстратной специфичностью TG2 для агрегированных белков, связанных с заболеванием, и повышенными уровнями экспрессии TG2 позволяет предположить роль ферментативно активной TG2 при каждом заболевании.

Показано, что ингибиторы TG проявляют терапевтические эффекты в многочисленных биологических моделях нейродегенеративных заболеваний. В модели болезни Паркинсона на культуре клеток при одновременной трансфекции клеток COS-7 альфа-синуклеином и TG2 образуются ковалентные агрегаты альфа-синуклеина, напоминающие тельца Леви при болезни Паркинсона, и образование этих агрегатов зависит от ферментативно активной TG2, поскольку мутант C277S, инактивирующий TG2, неспособен индуцировать образование агрегатов. Обработка этих котрансфицированных клеток цистамином значительно уменьшала количество агрегатов альфа-синуклеина, а также процент клеток, содержащих эти аг-

регаты. Имеется два других сообщения, в которых белки нормальной длины и белки с экспансией поли-глутаминовых повторов, репрезентативные для заболеваний, характеризующихся экспансией CAG, таких как болезнь Гентингтона, трансфицированы в клеточные линии, и показано, что они образуют агрегаты. Обработка этих клеточных линий конкурентным ингибитором TG монодансилкадаверином приводила к уменьшению ядерной фрагментации, тогда как обработка цистамином приводила как к уменьшению ядерной фрагментации, так и к уменьшению образования белковых агрегатов. Примером универсального ингибитора TG является 1,3-диметил-2-[(2-оксопропил)тио]имидазолия хлорид, имеющийся в продаже от фирмы Zedira GmbH, на который ссылаются в некоторых публикациях как на NTU283 или г283.

Цистамин обладает полезным терапевтическим эффектом *in vivo* при дозировании в моделях болезни Гентингтона на мышах. У мышей Huntington R6/2, дозированных цистамином, показана улучшенная двигательная функция, менее тяжелая потеря массы и повышенная выживаемость по сравнению с необработанными контролями. Важно, что активность TG2 *ex vivo* в гомогенатах головного мозга была более низкой после дозирования цистамином по меньшей мере через 60 мин после инъекции. В различных моделях болезни Гентингтона на мышах линии YAC128 цистамин был способен снижать уровень стриарной атрофии, но неспособен улучшать массу тела животного или двигательную функцию, что указывает на полезный эффект цистамина на клеточном и тканевом уровне, но не при симптомах заболевания.

Вероятно, наиболее убедительное свидетельство, что полезный терапевтический эффект цистамина на мышах Huntington не зависит от ингибирования TG2, дает скрещивание мышей R6/2 Huntington с нокаут-мышами по TG2 с получением линии, склонной к нейродегенерации в отсутствие TG2. При обработке мышей R6/2 TG2<sup>-/-</sup> цистамином улучшенная двигательная функция и увеличенная продолжительность жизни статистически не отличались от наблюдаемых у мышей R6/2 TG2<sup>+/+</sup>, обработанных цистамином. Кроме того, мыши R6/1 и R6/2 TG2<sup>-/-</sup> имели повышенные уровни нейрональных белковых агрегатов по сравнению с мышами R6/1 и R6/2 TG2<sup>+/+</sup>, что позволяет предположить механизм агрегации белка, независимый от трансамидирующей активности TG2 в этих моделях. Тем не менее, примечательно, что мыши R6/2 TG2<sup>-/-</sup> проявляли задержку появления нарушения двигательной функции и улучшенную выживаемость по сравнению с мышами R6/2 TG2<sup>+/+</sup>, что подразумевает роль TG2 в патогенезе нейродегенерации в модели R6/2.

TG2 также в значительной степени вовлечена в целиакию, поражающую одного на 100 человек в Западной Европе. Целиакия-спру (глутеновая энтеропатия) представляет собой опосредованное T-клетками воспалительное расстройство тонкого кишечника, вызванного классом белков, называемых проламинами, обнаруженными в пшенице, ячмене и ржи. Высокое содержание пролина и глутамина этих белков делает их устойчивыми к природным протеазам и пептидазам желудка, поджелудочной железы и кишечника в процессе пищеварения. Полученные в результате пептидные фрагменты остаются плохо переваренными в тонком кишечнике и получают доступ к собственной пластинке подслизистой оболочки кишечника, где после модификации ферментом TG2 они могут стимулировать опосредованный T-клетками иммунный ответ, приводящий к воспалению и деструкции кишечной структуры. Кишечная TG2 деамидирует определенные остатки глутамина в проламиновых пептидах до остатков глутамата. У индивидуумов HLA-DQ2/8 эти модифицированные пептиды презентуются соответствующим аутореактивным T-клеткам молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса II. Хотя проламины имеют высокое содержание глутамина (около 30-35%), только немногие из этих остатков глутамина являются мишенями TG2 человека. Отличная корреляция между субстратной специфичностью TG2, связывающим сродством DQ2 и стимулирующим потенциалом в отношении T-клеток проламинов, обработанных TG2, в высокой степени позволяет предположить, что деамидирование пептидов опосредовано TG2 и играет значительную роль при определении тяжести заболевания. Кроме того, у пациентов с глютеновой болезнью образуется ответ аутоантител на комплексы TG2-глиадин. Эти антитела против TG2 обнаружены как в тонком кишечнике, где показана их совместная локализация с внеклеточной TG2, так и в крови, где их используют в качестве диагностического маркера заболевания.

Несмотря на отсутствие моделей целиакии на животных, эксперименты *ex vivo* показывают, что ингибирование TG2 обладает потенциальной пользой для пациентов с целиакией-спру. Культивирование биопсий тонкого кишечника пациента с целиакией с глютенем, либо обработанным TG2 (деамидированным), либо не обработанным TG2 (не деамидированным), привело в результате к образованию линий T-клеток пациента, преимущественно распознающих деамидированные пептиды глютена вероятнее, чем недеамидированные пептиды глютена. Также, путем блокирования активности эндогенной TG2 в биопсиях целиакии цистамином, более чем половина полученных в результате линий T-клеток обладала сниженными пролиферативными ответами по сравнению с контролями, не обработанными цистамином. Линии клеток не давали хороший ответ на недеамидированные продукты расщепления. Эти результаты подразумевают, что, поскольку популяции T-клеток, реагирующие на глютен, в биопсиях кишечника пациентов с целиакией обладают природной склонностью в направлении распознавания деамидированных пептидов глютена по сравнению с недеамидированными пептидами, эндогенная активность TG2 в этих биопсиях может приводить в результате к деамидированию пептидов глютена *in situ*, и что обработка биопсий пациентов с глютеновой болезнью ингибиторами TG2 может снизить пролиферативный ответ глютен-реактивных T-клеток.

В другом исследовании показано, что универсальный ингибитор TG 2-[(2-оксопропил)тио]имидазоль был способен предотвращать *in situ* образование поперечных сшивок пептидов глютена с эндогенными белками в тонких срезах ткани, взятой как от пациентов с целиакией-спру, так и от контрольных пациентов. Важнее, что авторы показали, что инкубация интактных биопсий тонкого кишечника пациентов с целиакией с 2-[(2-оксопропил)тио]имидазолием предотвращала активацию Т-клеток, индуцированную недеамидированной формой иммунодоминантного пептида глютена. В противоположность этому, ингибирование TG было неэффективно при контроле активации Т-клеток, когда эти биопсии инкубировали с деамидированным вариантом того же пептида. Эти результаты позволяют предположить, что ингибирование эндогенной TG2 в биопсиях пациентов с целиакией может предотвращать деамидирование глютенных пептидов и, следовательно, снижать активацию Т-клеток.

Несколько наблюдений подтверждает гипотезу о том, что TG2 играет роль в развитии некоторых типов рака. Многочисленные исследования показали, что белок TG2 претерпевает повышающую регуляцию в раковой ткани относительно здоровой ткани при таких раках, как глиобластомы, злокачественные меланомы и протоковые аденокарциномы поджелудочной железы, называя лишь несколько. Продемонстрирована положительная корреляция между химиотерапевтической резистентностью и метастатическим потенциалом определенных раков и уровнями экспрессии TG2, причем, показано, что в определенных типах клеток TG2 проявляет антиапоптотические эффекты на клетках, тогда как понижающая регуляция посредством малой интерферирующей РНК (миРНК) уровней экспрессии белка TG2 или обработка ингибиторами TG2 сенсibiliзирует эти клетки к апоптозу. С другой стороны, также имеются сообщения о понижающей регуляции экспрессии TG2 при определенных типах рака [18]. Недавно показано, что TG2 является партнером связывания для белка GPR56, претерпевающего понижающую регуляцию в высоко метастатических раковых клетках, что позволяет предположить, что TG2 может действовать как белок, являющийся опухолевым супрессором, посредством ее взаимодействия с GPR56 [18].

Современные ингибиторы трансглутаминазы делятся на 3 основных класса: 1) конкурентные аминные ингибиторы (например, цистамин и спермин), конкурирующие с природными аминными субстратами; 2) обратимые аллостерические ингибиторы, такие как ГТФ и вновь открытый класс соединений, имеющих тиено[2,3-d]пиримидин-4-он-ацилгидразидный остов; и 3) необратимые ингибиторы, включающие производные 2-[(2-оксопропил)тио]имидазолия (ацетируют активный сайт цистеина), 3-галогено-4,5-дигидроизооксазолы (образуют стабильный иминотиоэфир в активном сайте) и аналоги карбобензилокси-L-глутаминилглицина с рядом встроенных реакционных группировок.

Большинство из них использовано в описанных выше экспериментальных системах, и показаны полезные результаты. Тем не менее, ни один из этих ингибиторов не проявляет специфичность к изоформе TG, поскольку все они нацелены на консервативную каталитическую триаду внутри каталитического центрального участка семейства трансглутаминаз. Следовательно, все они обладают потенциальным недостатком совместного ингибирования Фактора XIIIa, TG1 и TG3, которое предотвращает их применение при заболеланиях человека вследствие побочных эффектов, которые можно ожидать.

В WO 2006/100679 раскрыто специфичное антитело против TG2, полученное с помощью рекомбинантной технологии из образцов, собранных от трех взрослых пациентов с целиакией, обладающих высокими титрами антитела против TG2.

С учетом ассоциации TG2 с многочисленными болезненными состояниями и убедительных данных, полученных для неспецифических ингибиторов, существует необходимость в высоко селективных и высокоэффективных ингибиторах TG2, обладающих минимальными нецелевыми эффектами.

Перечисление или обсуждение явным образом ранее опубликованного документа в данном описании необязательно следует рассматривать как признание того, что этот документ составляет часть уровня техники или представляет собой общедоступные сведения.

В первом аспекте настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, селективно связывающиеся с эпитопом внутри центрального участка трансглутаминазы типа 2 (TG2).

В определенных воплощениях изобретения рассмотрено, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент селективно связывается с эпитопом внутри центрального участка TG2 человека, TG2 крысы и/или TG2 мыши. В особенно предпочтительном воплощении изобретения TG2 представляет собой TG2 человека.

Полноразмерные аминокислотные последовательности TG2 человека, крысы и мыши можно найти под номерами доступа в Genbank NM\_004613, NM\_019386.2 и NM\_009373.3. Кодировующий участок этих последовательностей приведен ниже.

Нуклеотидная последовательность TG2 человека:

```
atggccgagggagctggctcttagagaggggtgatctggagctggagaccaatggccgagaccaccac
acggccgacctgtgccgggagaagctgggtggtgcgacggggccagcccttctggctgacctgac
tttagggccgcaactacgagggccagtgtagacagctctcaccttcagtgtcgtgaccggccagcc
```

cctagccaggaggccggaccaaggcccgttttccactaagagatgctgtggaggaggggtgactgg  
 acagccaccgtggtggaccagcaagactgcaccctctcgctgcagctcaccaccccgccaacgcc  
 cccatcggcctgtatcgctcagcctggaggcctccactggctaccaggatccagctttgtgctg  
 ggccacttcattttgctcttcaacgcctggtgccagcgatgctgtgtacctggactcggaagag  
 gagcggcaggagtatgtcctcaccagcagggtttatctaccagggtcggccaagtcatcaag  
 aacataccttggaattttggcagtttgaagatgggatcctagacatctgcctgatccttctagat  
 gtcaaccccaagttcctgaagaacgcggccgctgactgctcccgcgcagcagccccgtctactgtg  
 ggcgggtggtgagtgcatggtcaactgcaacgatgaccagggtgctgctgggacgctgggac  
 aacaactcggggacggcgtcagccccatgtcctggatcggcagcgtggacatcctcggcgctgg  
 aagaaccacggctgccagcgcgtcaagtatggccagtgctgggtcttgcggccgtggcctgcaca  
 gtgctgaggtgctggcatccctaccgcgctgctgaccaactacaactcggcccatgaccagaac  
 agcaaccttctcatcgagtacttccgcaatgagtttggggagatccagggtgacaagagcgagatg  
 atctggaacttccactgctgggtggagtctggtgaccaggccggacctgcagccgggtacgag  
 ggctggcaggccctggaccaacgcccaggagaagagcgaaggacgtactgctgtggccagtt  
 ccagtctgtgccatcaaggagggcgacctgagcaccaagtagatgcgccctttgtctttgaggag  
 gtcaatgcccagctggttagactggatccagcaggacgatgggtctgtgcacaaatccatcaaccgt  
 tccctgatcgttggctgaagatcagcactaagagcgtgggcccgcagcagcgggagatcacc  
 cacacctacaataaccagaggggtcctcagaggagaggagccctcacaagggcgaaccacctg  
 aacaaactggccgagaaggaggagacagggatggccatcgggatccgtgtggccagagcatgaac  
 atgggcagtgactttgacgtctttgccacatcaccacaacaccgctgaggagtacgtctgccgc  
 ctctgctctgtgccgcaccgtcagctacaatgggatcttggggcccagtggtggcaccagtag  
 ctgctcaacctcaactggagcctttctctgagaagagcgttctctttgcatcctctatgagaaa  
 tacctgactgccttacggagtccaacctcatcaaggtgcccgcctcctcgtggagccagtatc  
 aacagctacctgctggctgagaggacctctacctggagaatccagaaatcaagatccggatcctt  
 ggggagcccaagcagaaaacgcaagctggtggctgaggtgtccctgcagaaccgctcctgtggcc  
 ctggaaggctgcacctcactgtggagggggccggcctgactgaggagcagaagacgggtgagatc  
 ccagaccccggtggaggcaggggaggaagtaaggtgagaatggacctgctgcgctccacatgggc  
 ctccacaagctggtggtgaacttcgagagcgacaagctgaaggctgtgaaggcttccggaatgtc  
 atcattggccccgctaa

**Аминокислотная последовательность TG2 человека:**

MAEELVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLTLHFEGRNYEASVDSLTF  
 VVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQDCTLSLQLTTPANAPIGLYRLSLE  
 ASTGYQSSSFVLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEERQEYVLTQQGFIYQGSAKFIKNI  
 PW NFGQFEDGILDI CLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVS GMVNCND  
 DQGVLLGR WDNNGDGVSPMSWIGSVDILRRWKNHGCRVKYGCWVFAAVACTVLRCLGI  
 PTRVVTN YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQDKSEMIWNFHCWVESWMT  
 RPDLPQGYEGWQALDPT PQEKSEGTCCGPVVRRAIKEGDLSTKYDAPFVFAE  
 VNADVVDWIQQDDGSVHKSINRSL IVGLKISTKSVGRDEREDITHYKYPEGS  
 SEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVG QSMNMGSDFDVFAHITNNTA  
 EBYVCRLLLCARTVSYNGILGPECGTKYLLNLEPFSEK SVPLCILYEKYRDC  
 LTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQK RKLVAE  
 VSLQNPLPVALEGCTFTVEGAGLTTEEQKTVEIPDPVEAGEEVKVRMDLLPLH  
 MG LHKLVVNFESDKLKAVKGFNRVVIIGPA\*

**Нуклеотидная последовательность TG2 крысы:**

atggccgaggagctgaacctggagaggtgcgatttggagatacaggccaatggccgtgatcaccac  
acggccgacctgtgccaaagaaaactgggtgctcgggcgaggccagcgcttccggctgacctgtac  
ttcagaggccgtgctatgaggccagcgtggacagacttacatttgggtgacctgaccggccagat  
cccagtgaaagagcaggaccacaaggcccgcttctcactgtctgacgatgtggaggaggatcctgg  
tcagcctctgtgctggaccaacaggacaatgtcctctcgctgcagctctgacccccagccaatgct  
cctgttggccagtaaccgctcagcctggagacttotactggctaccaaggctccagcttcatgctg  
ggtaacttcatcctgctctcaatgcctggtgcccagcggatgacgtgtacctaagattcagaggcg  
gagcgccgggaatacgtcctcacacagcagggttcatctaccagggtctgtcaagttcatcaag  
agtgtgaccttggaaacttggcagtttgaggatgggatcctggatgctgctgctgcttggat  
gtgaacccccaaagtctcctgaaggaccgtagccgggactgctcacgacgcagcagtcctcatatgtg  
ggccgctggtgagcggcatggtcaactgcaatgatgaccagggtgtgcttctgggtcgctgggac  
aacaattatggggacggtatcagtcctatggcctggattggcagcgtggacattctgcccgtgg  
aaggaacacggctgtcagcaagtgaagtatggccagtgtgggtgttggcgggtagcctgcaca  
gtgtgctgctgcttggcatccctaccagagtggtgaccaactacaactccgccacgaccagaac  
agcaacctgctcatcgagtacttccgaacgagtacggggagctggagagcaacaagagcgagatg  
atctggaatttccactgctgggtggagtctctggatgaccaggccagacctacagccaggctatgag  
gggtggcagccattgacccccacccgaggagaagagcgaaggacaatactgttggccagctc  
tcagtgccggccatcaaggaggggtgacctgagcaccagaatgatgctgctctcggttggccgag  
gtcaacgctgatgtggtgactggatccggcagtcagatgggtctgtgctcaaatccatcaacaat  
tcctgtgctgctggggcagaagatcagcactaagagcgtgggcccgtgatgacccgggagcatcacc  
tatacctacaagtaccagaggggtccccagaggagagggaaagtcttaccagagccaaccacctg  
aacaactggcagagaagaggagacaggggtggccatgcccagtcaggatgggggatggtatgagc  
ttgggcaatgactttgacgtgttggccacatcggcaacgacacctcgagagccgtgagtgccgc  
ctcctgctctgtgcccactgtcagctacaacggcgtgctggggcccagtggtgactgaggac  
atacaacctgacctggatccctactctgagaacagcatcccccttccgcatcctctacgagaagtac  
agcgggtgctgacctgacagagtaaacctcatcaaggtgcccgggtctcctcgtagcagcccgctaac  
agctacctgctggctgagagagatctctacctggagaatcctgaaatcaagatccggatcctgggg  
gagcccaagcagaaccgcaactgggtggctgaggtgtccctgagaaccactttctgatccctg  
tatgactgtgtcttcaactgtggaggggctggcctgaccaaggaaacagaagtctgtggaggtctca  
gacctgtgcccagcagagatgcccgaagggtgcccgttgacctgttcccagctgatattggcctc  
cacaagttggtggaacttccagtgacaagctgaagtccgtcaagggttaccggaatatcatc  
atcgccccggcctaag

**Аминокислотная последовательность TG2 крысы:**

MAEELNLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRGQRFRLTLTFEGRGYEASVDRLTFG  
AVTGPDPSEEAGTKARFSLSDDEEGSWSASVLDQQDNVLSLQLCTPANAPVGQYRLSLE  
TSTGYQGSSFMLGHFILLFNAWCFADDVYLDSEARREYVLTQQGFIYQGSVKFIKSVPW  
NFGQFEDGILDACLMLLDVNPFLKDRSRDCSRRSSPIYVGRVVSVMVNCNDQGVLLGR  
WDNNYDGI SPMAWIGSVDILRRWKEHGCQVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN  
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPT  
PQEKSEGTCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDASFVFAEVNADVVDWIRQSDGSVLKSINNSL  
VVGQKISTKSVGRDDREDITYTYKYPEGSPPEEREVFTTRANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG  
DGMSLGNDFVFAHIGNDTSESRECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTLDPYSENS  
IPLRIYKESGCLTESNLIKVRGLLVEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQNR  
KLVAEVS LKNPLSDSLYDCVFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDAVKVRVDFPTDIGL  
HKLNVNFQCDKLSVKGYRNIIGPA\*X

**Нуклеотидная последовательность TG2 мыши:**

atggcagaggagctcctcggagaggtgtgattggagattcaggccaatggccgtgaccaccac  
 acggccgacctatgccaagagaactgggtgctgctgctggtcagcgcttccggctgactctgtac  
 ttcgagggccgtggtaacgagggccagcgtggacagcctcaggttcggtgctgtgaccggccccagat  
 cccagtgaaagggcagggaccaagggccgcttctcactgtctgacaatgtggaggagggatcttgg  
 tcagcctcagtgctggaccaacaggacaatgtcctctcgctacagctctgacccccagccaatgct  
 cctatggcctgtaccgtctcagcctagaggttctactggctaccagggctccagctttgtgctg  
 ggccacttcatcctgctctacaatgcctgggtgccagccgatgatgtgtacctagactcagaggag  
 gaggcaggggaatatgtccttacgcaacagggcttcatctaccaaggctctgtcaagttcatcaag  
 agtgtgcttggaaactttggcagctcgaggatggaatcctggatacctgctgctgtcttggat  
 atgaacccccaaagtctcgaagaaccgtagtcgggactgctcacgcccagcagctcccacatctgtg  
 ggcccgctggtgagcgcatggtaactgcaatgatgaccaggggtgtgcttctgggcccgtgggac  
 aacaactatggggatggatcagtcctcagcctggatggcagtggtgacattctgcccgtggtg  
 aaggaacacggctgtcagcaagtgaagtaacggcagtgctgggtgttgcagcggggcctgcaca  
 gtgctgcggtgctcggcatccctaccagagtggtgaccaactacaactccgccccagaccagaac  
 agcaacctgctcatcgagtaactccgaaatgagttcggggagctggagagcaacaagagcgagatg  
 atctggaaactccactgctgggtggagtctcctggatgaccagggccagacctacagccgggctatgag  
 ggggtggcagggcattgacccccacaccagagagaagcggaagggacatactgttggcccagctc  
 tcagtgagccatcaaggaggagacctgagtaccaagatgatgacacctctggttggccgag  
 gtcaacgctgatgtggtggactggatccggcaggaagatgggtctgtgctcaaatccatcaaccgt  
 tccttggctgctgggagagaatcagcactaagagtggtggccgtgatgaccggggagacatccc  
 catacctacaagtaccagaggggtcaccggagagaggggaagtcttccaagggccaaccacctg  
 aacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgctcagcagtggtgggagcagatgagc  
 atgggcaacgacttcgacgtgttggccacatcggaacgacacctcgggagactcgagagtgctgt  
 ctctgctctgtgcccactgtcagctacaacgggtgctggggcccagtggtggcactgaggac  
 atcaacctgacctggatccctactctgagaacagcatcccacttcgaatcctctacgagaagtac  
 agcgggtgctgacagagtcacaacctcatcaaggtgcccgggcttctcatcgaaccagctgccaac  
 agctacctgctggctgagagagatctctacctggagaatcccgaatcaagatccgggtcctggga  
 gaacccaagcaaaaaccgaaaactggctgaggtgtcctgaagaacccaacttccgatcccctg  
 tatgactgcatcttactgtggaggggctggcctgaccaaggagcagaagtctgtggaagtctca  
 gacccgggtgccagcggcgatttggtaaggcacgggtcgacctgttcccactgatattggcctc  
 cacaagctggtggtgaactccagtgtagaagctgaagtcggtaaggggtaccggaatgtatc  
 atcggccccgcctaa

**Аминокислотная последовательность TG2 мыши:**

MAEELLRLERCLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRGQRFRRLTYFEGRGY  
 EASVDSLTFGAVTGPDPSEEAGTKARFSLSDNVEEGSWSASVLDQQDNVL  
 SLQLCTPANAPIGLYRLSLEASTGYQSSFVLGHFILLYNWCPADDVYL  
 DSEEEERREYVLTQQGFYQGSVKFIKSVPNWFGQFEDGILDTCMLLDMN  
 PKFLKNRSRDCSRSSPIYVGRVVSAMVNCNDQGVLLGRWDNNYDGIS  
 PMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN  
 YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPG  
 YEGWQAIDPTPQEKSEGTYYCCGPVSVRAIKEGLSTKYDAPFVFAEVNAD  
 VVDWIRQEDGSVLKSNRSLVVGQKISTKSVGRDDREDITHYKYPEGSP  
 EEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVGDSSMSGNDFDVFANIGNDTS  
 ETRECRLLLARTVSYNGVLGPECGETEDINLTLDPYSENSIPLRILYEKY  
 SGCLTESNLIKVRGLLIEFAANSYLLAERDLYLENPEIKIRVLGEPKQNR  
 KLVAEVLKRNPLSDPLYDCIFTEVAGLTKQKSVEVSDPVPAGDLVKAR  
 VDLFPTDIGLHKLVVNFQCDKLKSVKGYRNVII GPA

Авторы настоящего изобретения получили антитела к TG2 путем иммунизации мышей рекомбинантным белком, включающим аминокислоты 143-473 центрального участка TG2 человека. Гибридомы подвергли скринингу на специфичность к TG2 и ее ингибирование любыми подходящими клонированными кандидатами. IgG был очищен из них для вычисления эффективности, и эпитоп-мишень картировали путем скрининга библиотеки TG2 человека с помощью фагового дисплея.

Настоящий подход к получению антител против TG2 путем использования рекомбинантного центрального белка TG2 не был предпринят ранее и неожиданно привел к выделению и характеристике антител к TG2, обладающих высокой селективностью к TG2 и показывающих сильные ингибиторные харак-

теристики. Прежние попытки получения антител к TG2 привели к выделению относительно неселективных антител, перекрестно реагирующих с другими членами семейства трансглутаминаз, и, следовательно, не являющихся перспективными антителами для клинического применения. Антитела по настоящему изобретению, с другой стороны, являются перспективными кандидатами для клинических испытаний для заболеваний, обостряющихся в результате активности TG2 или опосредованных этой активностью.

Неожиданно, что подход по настоящему изобретению привел к получению значительно более эффективных антител, чем полученные ранее. Не было никакой гарантии, что возможно получить антитела, являющиеся эффективными ингибиторами TG2 путем иммунизации центральным участком. Как указано выше, антитела, являющиеся эффективными ингибиторами, могут не обладать достаточной специфичностью к TG2, чтобы эффективно применяться в медицине. Неожиданно, что антитела к дивергентным участкам (в частности, центральным участкам, несколько различающимся между различными членами семейства трансглутаминаз TG2) являются эффективными и селективными ингибиторами TG2.

Не связываясь какой-либо теорией, авторы изобретения считают, что путем образования антител к белку меньшего размера, покрывающему только центральный участок, авторы изобретения устраняют не только предпочитаемые иммунологические эпитопы, присутствующие на полноразмерном белке, но также усиливают нацеливание на центральный участок. По-видимому, это увеличивает разнообразие антител, доступных для отбора, и обеспечивает более широкое покрытие центрального участка.

Иммунизация только центральным участком TG2 удаляла большую часть третичной структуры фермента (в частности, два карбоксиконцевых домена типа бета-баррель). Возможно, что некоторые из эпитопов, которые, вероятно, менее доступны или иммуногенны в пределах полноразмерной нативной молекулы TG2, могут представлять собой более привлекательные эпитопы с центральным участком в формате, раскрытом в данном изобретении. Антитела, раскрытые в данном изобретении, распознавали линейные эпитопы (то есть связанные с TG2 на восстанавливающем полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ)), тогда как 80% антител, которые ранее выделили авторы изобретения с использованием полноразмерного TG2 в качестве иммуногена, были конформационно-зависимыми. Авторы изобретения смогли показать, что рекомбинантный центральный домен сохранял ферментативную активность, и, таким образом, выделение ингибиторных антител было, вероятно, нацелено на открытие прежде менее предпочитаемых эпитопов, локализованных в активном центре или вблизи него. Интересно и неожиданно, что ингибиторные антитела к TG2 образовывали путем иммунизации центральным участком, учитывая то, что рекомбинантный центральный белок мог не показать такие же характеристики свертывания, как полноразмерный белок.

Каталитический центральный участок TG высоко консервативен между членами семейства TG и между видами. Это позволяет предположить, что разработка не только специфичных низкомолекулярных ингибиторов, но также ингибиторов на основе антител, может быть технически проблематична. Тем не менее, в настоящем изобретении предложены антитела, являющиеся в высокой степени селективными. То, что это возможно, может отражать тот факт, что в пределах каталитического домена TG2 имеется несколько участков, где существует некоторая гетерогенность. В настоящих антителах, следовательно, можно использовать эти небольшие различия. Неожиданная селективность настоящих антител может обеспечить разработку терапевтических средств, которые могут эффективно препятствовать активности TG2 и, следовательно, обеспечивать потенциально эффективные терапевтические методы лечения патологических состояний, обостряющихся за счет активности TG2 или вызванных ее активностью, где в настоящее время выбор терапии отсутствует.

В качестве сравнения, антитела, раскрытые в WO 2006/100679, которые были получены с помощью рекомбинантной технологии из образцов от трех взрослых пациентов с целиакией, имеющих высокие титры антител против TG2, оказались обладающими низкой эффективностью при тестировании авторами настоящего изобретения (пример 2). Антитела по настоящему изобретению были значительно лучше по сравнению с антителами по WO 2006/100679 в отношении селективности к TG2 и в отношении ингибиторной активности. Например, авторы настоящего изобретения получили Fab фрагмент антитела по WO 2006/100679, применяемый в анализах ингибирования TG2 в такой же концентрации, как и антитела по настоящему изобретению. Количество Fab фрагментов в тестах находилось в двукратном молярном избытке по сравнению с антителами по настоящему изобретению, но они все же были неспособны вызвать какое-либо ингибирование активности TG2. При тестировании полноразмерного антитела по WO 2006/100679 на ингибирование в стандартном анализе включения путресцина, разработанном авторами изобретения, ингибирование активности TG2 не было обнаружено. Таким образом, способы по настоящему изобретению и антитела, полученные этими способами, являются усовершенствованными по сравнению с раскрытыми ранее.

В "антитело" авторы изобретения включают по существу интактные молекулы антитела, а также химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела (где по меньшей мере одна аминокислота мутирована относительно встречающихся в природе антител человека), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела, тяжелые цепи антител, легкие цепи антитела, гомодимеры и гетеродимеры тяжелых и/или легких цепей антитела, а также их антигенсвязывающие фрагменты и их производные. В понимании терминов "антитело" и "его антигенсвязывающие фрагменты" авторы изобретения



также включают варианты, слияния и производные антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

Термин "антитело" также включает все классы антител, включая IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Таким образом, антитело может представлять собой молекулу IgG, такую как молекула IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно антитело по изобретению представляет собой молекулу IgG или ее антигенсвязывающий фрагмент или вариант, слияние или производное. Более предпочтительно антитело представляет собой молекулу IgG2.

Описанные антитела, композиции, применения и способы включают варианты, слияния и производные определенных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, а также слияния этих вариантов или производных, при условии, что такие варианты, слияния и производные обладали специфичностью к TG2.

Поскольку антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают один или более полипептидных компонентов вариантов, слияний и производных антитела и его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном изобретении, они могут быть получены с применением способов белковой инженерии и сайт-направленного мутагенеза, хорошо известных в данной области техники, используя рекомбинантные полипептиды (см., например, кн. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, включенную в данное описание посредством ссылки).

Таким образом, варианты, слияния и производные описанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть получены на основе полипептидного компонента антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В "слияние" авторы изобретения включают полипептид, слитый с каким-либо другим полипептидом. Например, этот полипептид может быть слит с таким полипептидом, как глутатион-S-трансфераза (GST; от англ. "glutathione-S-transferase") или белок A, чтобы облегчить очистку данного полипептида. Примеры таких слияний хорошо известны специалистам в данной области техники. Аналогично, данный полипептид может быть слит с олиго-гистидиновой меткой, такой как His6, или с эпитопом, распознаваемым антителом, таким как хорошо известный эпитоп Мус-tag. Слияния с любым вариантом или производным данного полипептида также включены в объем изобретения. Понятно, что предпочтительны слияния (или их варианты или производные), сохраняющие желаемые свойства, такие как связывающая специфичность к TG2.

Слияние может включать дополнительный участок или состоять из этого участка, который придает желаемый признак данному полипептиду; например этот участок может быть полезен при обнаружении или выделении полипептида или может стимулировать захват полипептида клеткой. Этот участок может представлять собой, например, биотиновую группировку, радиоактивную группировку, флуоресцентную группировку, например низкомолекулярный флуорофор или флуорофор, представляющий собой зеленый флуоресцентный белок (GFP; от англ. "green fluorescent protein"), как хорошо известно специалистам в данной области техники. Эта группировка может представлять собой иммуногенную метку, например Мус-метку (Мус-tag), как известно специалистам в данной области техники, или может представлять собой липофильную молекулу или полипептидный домен, способные стимулировать захват полипептида клеткой, как известно специалистам в данной области техники.

"Варианты" данного полипептида авторы изобретения относят к полипептиду, в одном или более положений которого находятся инсерции, делеции и/или замены аминокислот, либо консервативные, либо неконсервативные, при условии, что результатом таких изменений является белок, основные свойства которого, например, связывающие свойства, термостабильность, активность в определенном диапазоне pH (pH-стабильность) значительно не изменены. "Значительно" в данном контексте означает, что специалист в данной области техники считал бы, что свойства варианта могут все же отличаться, но не очевидно, от свойств исходного белка. Таким образом, авторы изобретения включают варианты полипептида, где такие изменения по существу не изменяют активность данного полипептида. В частности, авторы изобретения включают варианты полипептида, где такие изменения по существу не изменяют связывающую специфичность к TG2.

Под "консервативными заменами" подразумевают комбинации, такие как Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg и Phe, Tyr.

Такие варианты могут быть получены, используя способы белковой инженерии и сайт-направленного мутагенеза.

Вариант полипептида может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75% идентичностью одной или более из аминокислотных последовательностей, приведенных в данном изобретении, например по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью одной или более из аминокислотных последовательностей, указанных в данном изобретении.

Процент идентичности последовательности между двумя полипептидами может быть определен с использованием подходящих компьютерных программ, например программы GAP University of Wisconsin Genetic Computing Group, и понятно, что процент идентичности вычисляют в отношении полипептидов, последовательности которых оптимально выровнены.

Выравнивание можно альтернативно осуществить, используя программу Clustal W (как описано в статье Thompson et al., 1994, Nucl. Acid Res. 22:4673-4680, включенной в данное описание посредством ссылки).

Используемые параметры могут быть следующими.

Параметры быстрого попарного выравнивания: размер участка максимального совпадения (K-tuple(word)): 1, размер окна: 5, штраф на гэп: 3, число верхних диагоналей: 5. Способ оценки: процент х.

Параметры множественного выравнивания: штраф на открытие гэпа: 10, штраф на удлинение гэпа: 0,05.

Матрица оценки: BLOSUM.

Альтернативно, для определения локальных выравниваний последовательности можно использовать программу BESTFIT.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, вариант, слияние или производное, используемые в способах или применениях по изобретению, могут включать одну или более модифицированных или дериватизированных аминокислот или состоять из одной или более модифицированных или дериватизированных аминокислот.

Химические производные одной или более аминокислот могут быть получены путем взаимодействия функциональной боковой группы. Такие дериватизированные молекулы включают, например, молекулы, в которых свободные аминогруппы дериватизированы с образованием гидрохлоридов амина, паратолуолсульфонильных групп, карбоксибензоксигрупп, трет-бутилоксикарбонильных групп, хлорацетильных групп или формильных групп. Свободные карбоксильные группы могут быть дериватизированы с образованием солей, метиловых и этиловых эфиров или других типов сложных эфиров и гидразидов. Свободные гидроксильные группы могут быть дериватизированы с образованием О-ацильных или О-алкильных производных. В качестве химических производных также включены пептиды, содержащие производные природных аминокислот из двадцати стандартных аминокислот. Например, 4-гидроксипролин может заменять пролин; 5-гидроксилизин может заменять лизин; 3-метилгистидин может заменять гистидин; гомосерин может заменять серин, и орнитин может заменять лизин. Производные также включают пептиды, содержащие одно или более из добавлений или делеций, если сохраняется нужная активность. Другими включенными модификациями являются амидирование, амино-концевое ацилирование (например, ацелирование или амидирование тиогликолевой кислоты), концевое карбоксиамидирование (например, аммиаком или метиламином) и подобные концевые модификации.

Кроме того, специалистам в данной области техники понятно, что могут быть также полезны пептидомиметические соединения. Таким образом, в "полипептид" авторы изобретения включают пептидомиметические соединения, способные связываться с эпитопом внутри центрального участка TG2. Термин "пептидомиметический" относится к соединению, имитирующему конформацию и желаемые признаки конкретного пептида в качестве терапевтического агента.

Например, данный полипептид включает не только молекулы, в которых аминокислотные остатки соединены пептидными связями (-CO-NH-), но также молекулы, в которых пептидная связь является обращенной. Такие ретро-инверсо-пептидомиметики могут быть получены, используя способы, известные в данной области техники, например, такие, как раскрыто в статье Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, включенной в данное изобретение посредством ссылки. Данный подход включает получение псевдопептидов, содержащих изменения, в которые вовлечен каркас, и не вовлечена ориентация боковых цепей. Ретро-инверсо-пептиды, содержащие связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, значительно более устойчивы к протеолизу. Альтернативно, полипептид может представлять собой пептидомиметическое соединение, где один или более из аминокислотных остатков связаны связью - $\text{u}(\text{CH}_2\text{NH})$ - вместо традиционной амидной связи.

В следующей альтернативе пептидная связь может вообще не требоваться при условии использования подходящей линкерной группировки, сохраняющей промежуток между атомами углерода аминокислотных остатков; может быть предпочтительным, чтобы эта линкерная группировка имела по существу такое же распределение заряда и по существу такую же плоскостность, как пептидная связь.

Понятно, что данный полипептид для удобства может быть блокирован на его N- или C-конце, чтобы способствовать снижению склонности к экзо-протеолитическому расщеплению.

Для модификации пептидов млекопитающих используют разнообразные неcodируемые или модифицированные аминокислоты, такие как D-аминокислоты и N-метиламинокислоты. Кроме того, предполагаемая биологически активная конформация может быть стабилизирована ковалентной модификацией, такой как циклизация, или включением лактама или других типов мостиковой связи, например, см. статьи Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2636 и Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166, включенные в данное описание посредством ссылки.

Общим предметом среди многих стратегий синтеза является введение какой-либо циклической группировки в каркас на основе пептида. Эта циклическая группировка ограничивает конформационное пространство пептидной структуры, и это часто приводит в результате к повышенной специфичности пептида к конкретному биологическому рецептору. Дополнительное преимущество данной стратегии состоит в том, что введение циклической группировки в пептид может также привести в результате к

пептиду, имеющему сниженную чувствительность к клеточным пептидазам.

Таким образом, иллюстративные полипептиды, полезные в способах и применениях изобретения, включают аминокислоты с концевым цистеином или состоят из них. Такой полипептид может существовать в гетеродетной циклической форме за счет образования дисульфидной связи меркаптидных групп в концевых аминокислотах, представляющих собой цистеин, или в гомодетной форме за счет образования амидной пептидной связи между концевыми аминокислотами. Как указано выше, циклизация низкомолекулярных пептидов посредством дисульфидных или амидных связей между N- и C-концевыми цистеинами может дать возможность преодолеть проблемы специфичности и времени полувыведения, иногда наблюдаемые для линейных пептидов, за счет уменьшения протеолиза, а также увеличение жесткости структуры, что может привести к образованию соединений более высокой специфичности. Полипептиды, замкнутые в цикл за счет дисульфидных связей, имеют свободные amino- и карбоксиконцы, которые все же могут быть чувствительны к протеолитическому расщеплению, тогда как пептиды, замкнутые в цикл амидной связи между N-концевым амином и C-концевым карбоксилем, таким образом, больше не содержат свободные amino- или карбоксиконцы. Таким образом, пептиды могут быть связаны либо C-N связью, либо дисульфидной связью.

Описанное никоим образом не ограничено способом циклизации пептидов, но включает пептиды, циклическая структура которых может быть достигнута за счет любого подходящего способа синтеза. Так, гетеродетные связи могут включать, но не ограничены ими, образование посредством дисульфидных, алкиленовых или сульфидных мостиковых связей. Способы синтеза циклических гомодетных пептидов и циклических гетеродетных пептидов, включая дисульфидные, сульфидные и алкиленовые мостиковые связи, раскрыты в патенте US 5643872, включенном в данное изобретение посредством ссылки. Другие примеры способов циклизации обсуждены и раскрыты в патенте US 6008058, включенном в данное изобретение посредством ссылки.

Следующим подходом к синтезу циклических стабилизированных пептидомиметических соединений является метатезис с замыканием цикла (RCM; от англ. "ring-closing metathesis"). Данный способ включает стадии синтеза пептидного предшественника и приведения его в контакт с катализатором RCM с образованием конформационно ограниченного пептида. Подходящие пептидные предшественники могут содержать две или более ненасыщенных C-C связей. Этот способ может быть выполнен, используя методы твердофазного пептидного синтеза. В данном воплощении изобретения предшественник, связанный с твердым носителем, приводят в контакт с катализатором RCM, а затем продукт отщепляют от твердого носителя с образованием конформационно ограниченного пептида.

Другой подход, описанный в кн. D.H. Rich in *Protease Inhibitors*, Barrett and Selveson, eds., Elsevier (1986), включенной в данное изобретение посредством ссылки, предназначен для разработки пептидомиметиков посредством применения концепции аналога переходного состояния в схеме ингибитора фермента. Например, известно, что вторичный спирт сталинита имитирует тетраэдрическое переходное состояние расщепляемой амидной связи субстрата пепсина.

В заключение, концевые модификации полезны, как хорошо известно, для снижения чувствительности к расщеплению протеиназами и, следовательно, для продления периода полувыведения пептидов в растворах, в частности в биологических жидкостях, где могут присутствовать протеазы. Циклизация полипептида также является полезной модификацией в связи с образованием стабильных структур в результате циклизации, а также в свете биологических активностей, наблюдаемых для циклических пептидов.

Таким образом, полипептид может быть циклическим. Тем не менее, полипептид может быть и линейным.

Под выражением "селективно связывается с эпитопом внутри центрального участка TG2" авторы изобретения подразумевают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны селективно связываться с эпитопом в центральном участке TG2. В выражение "способный селективно связываться" авторы изобретения включают такие связывающие группировки, образованные от антитела, которые связываются с центральным участком TG2 по меньшей мере в 10 раз сильнее чем с другими белками; например по меньшей мере в 50 раз сильнее или по меньшей мере в 100 раз сильнее. Эта связывающая группировка может обладать способностью к селективному связыванию с эпитопом в центральном участке TG2 в физиологических условиях, например, *in vivo*.

Такая связывающая специфичность может быть определена способами, хорошо известными в данной области техники, такими как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуногистохимия, иммунопреципитация, Вестерн-блоттинг и проточная цитометрия, с использованием трансфицированных клеток, экспрессирующих TG2 или центральный участок TG2 или его фрагмент. Подходящие способы для измерения относительных сил связывания включают иммунологические анализы, например, где связывающая группировка представляет собой антитело (см. кн. Harlow & Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, включенную в данное изобретение посредством ссылки). Альтернативно, связывание можно оценивать, используя конкурентные анализы или используя анализ Biacore® (Biacore International AB, Sweden).

Предпочтительно, чтобы антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывались

исключительно с TG2.

Специалистам в данной области техники понятно, что связывающую специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента придает присутствие участков определения комплементарности (CDR; от англ. "complementarity determining regions") внутри переменных областей составных тяжелых и легких цепей. Как обсуждается ниже, в особенно предпочтительном воплощении антител и их антигенсвязывающих фрагментов, определенных в данном изобретении, связывающую специфичность к TG2 придает присутствие одного или более идентифицированных участков CDR. Например, последовательности переменной области легкой цепи (VL; variable light chain) и переменной области тяжелой цепи (VH; variable heavy chain) антитела AB-1, которые могут включать последовательности CDR или состоять из них, включают следующие последовательности: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG и LISLY. В следующем примере последовательности VL и VH антитела BB-7, которые могут включать последовательности CDR или состоять из них, включают следующие последовательности: KASQDINSYLT, LTNRLMD, LQYVDFPYT, SSAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG и LISPY. Последовательности VL и VH антитела DC-1, которые могут включать последовательности CDR или состоять из них, включают следующие последовательности: KASQDINSYLT, LVNRLVD, LQYDDFPYT, THAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG и LISTY. Предпочтительно, чтобы антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, определенные в данном изобретении, включают последовательности CDR или CDR и фланкирующие последовательности или состоят из них, как определено в табл. 24A. Наиболее предпочтительно, чтобы антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, определенные в данном изобретении, включают последовательности CDR или CDR и фланкирующие последовательности иллюстративного антитела AB-1, либо BB-7, либо DC-1 (как определено, например, в табл. 24A), или состоят из этих последовательностей.

Предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сохраняли связывающую специфичность к TG2 исходного антитела. Под выражением "сохраняют связывающую специфичность" авторы изобретения подразумевают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны конкурировать за связывание TG2 с иллюстративными антителами по изобретению, например AB-1, AG-1, AG-9, AH-1, AH-3, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12, IA-12, DF-4, DH-2, DD-6 и/или DD-9 (см. сопроводительные примеры). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с тем же эпитопом TG2, что и антитело, включающее следующие последовательности: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG и LISLY.

Под "эпитопом" в данном изобретении следует подразумевать сайт молекулы, с которым связывается антитело, то есть молекулярный участок антигена. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, который определяется, например, аминокислотной последовательностью, то есть первичной структурой, или трехмерный эпитоп, определяемый вторичной структурой, например свертыванием пептидной цепи в бета-слой или альфа-спираль, или третичной структурой, например путем, которым свернуты или упорядочены спирали или слои, с получением трехмерной структуры антигена.

Способы определения того, обладает ли тестируемое антитело способностью к конкуренции за связывание со вторым антителом, хорошо известны в данной области техники (такие как, например, методы сэндвич-анализа ELISA или сэндвич-анализа ELISA с инвертированной последовательностью добавления реагентов) и описаны, например, в кн. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow & Lane (1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2), включенной в данное изобретение посредством ссылки.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие связывающей специфичностью к эпитопу в центральном участке TG2, могут также сохранять одно или более из тех же биологических свойств, что и исходное антитело (такое как иллюстративные антитела, предложенные в Примерах).

Как объяснено выше, TG2 представляет собой кальций-зависимый многофункциональный белок, катализирующий образование  $N\epsilon$ -( $\gamma$ -глутамил)лизин-изодипептидных связей между остатками лизина и глутамина. TG2 содержит N-концевой домен типа бета-сэндвич, содержащий сайты связывания (например, фибронектин) и последовательности, требующиеся для экспорта фермента. Этот домен связывается с каталитическим центральным доменом. К центру домена находится каталитическая триада, состоящая из Cys 277, Asp 358 и His 355, и дополнительно несколько предполагаемых сайтов связывания кальция. Этот домен связывается с третьим доменом, доменом 1 типа бета-баррель, где содержится ГТФ-связывающий сайт, придающий ферменту ГТФазную активность. Домен 1 типа бета-баррель также содержит сайт связывания интегрин, используемый при клеточной адгезии. Домен 1 типа бета-баррель параллельно с четвертым доменом TG2, доменом 2 типа бета-баррель, вовлечен в конформационное изменение TG2, требующееся для его активации. При высоком содержании кальция и низком содержании ГТФ в окружении складчатые домены 1 и 2 отклоняются вниз от закрытой и складчатой неактивной формы, что придает TG2 линейную структуру, открывая каталитический центральный участок, что дает возможность активации (Pinkas et al. (2007) *PLoS Biol.* Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. 5(12): e327).

В выражение "центральный участок трансглутаминазы типа 2 (TG2)" авторы изобретения включают участок TG2, содержащий описанную выше каталитическую триаду, исключая домен типа бета-сэндвич и домены 1 и 2 типа бета-баррель.

Предпочтительно центральный участок включает аминокислоты 143-473 TG2 человека или его фрагмента или состоит из них.

Аминокислоты 143-473 TG2 человека составляют следующую последовательность:

CPADAVYLDSEEEERQEYVLTQQGFIYQGSAKFIKNI PWNFGQFEDGILDICLILLLDVNPKE  
LKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVS GMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGVSPMSWIGSVDILRRW  
KNHGCRVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNYSANDQNSNLLIEYFRNEFGEIQG  
DKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTCCGVPVRAIKEGDLST  
KYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGSVHKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEREDITHYKYPE  
GSSEEREAFTTRANHLNKLAEKEETGM

Таким образом, в воплощении изобретения центральный участок может состоять из аминокислот 143-473 TG2 человека. В данном воплощении изобретения эпитоп антитела по изобретению может, следовательно, представлять собой любой эпитоп в пределах участка, определенного аминокислотами 143-473 TG2 человека. Таким образом, эпитоп может представлять собой фрагмент данной последовательности или может состоять из различных аминокислотных остатков в пределах данного фрагмента, которые могут не примыкать друг к другу в первичной аминокислотной структуре, но локализованы вместе друг с другом во вторичной, третичной или даже четвертичной структуре белка, как должно быть понятно специалистам в данной области техники.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может селективно связываться со всем участком или с частью участка, содержащего аминокислоты 304-326 TG2 человека. Данный участок (аминокислоты 304-326 TG2 человека) обозначен как группа 1 на фиг. 5 и включает аминокислотную последовательность AHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGD.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может селективно связываться со всем участком или с частью участка, содержащего аминокислоты 351-365 TG2 человека. Данный участок (аминокислоты 351-365 TG2 человека) обозначен как группа 2 на фиг. 5 и включает аминокислотную последовательность YEGWQALDPTPQEK.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может селективно связываться со всем участком или с частью участка, содержащего аминокислоты 450-467 TG2 человека. Данный участок (аминокислоты 450-467 TG2 человека) обозначен как группа 3 на фиг. 5 и включает аминокислотную последовательность SEEREAFTTRANHLNKLAE.

В предпочтительном воплощении любого аспекта изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность TG2, например активность TG2 человека.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение представляет собой антитело к трансглутаминазе типа 2 (TG2) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие следующие последовательности CDR:

KASQDINSYLT (LCDR1);  
LVNRLVD (LCDR2);  
LQYDDFPYT (LCDR3);  
THAMS (HCDR1);  
TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); и  
LISTY (HCDR3).

В предпочтительном варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

DITMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKILYLVNRLVDGVPSR  
FSGSGSGQDYALTISSLPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK,

и вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGRST  
YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGLTIVTSS,

или аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью с ними.

В другом аспекте настоящее изобретение представляет собой антитело к TG2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие следующие последовательности CDR:

KASQDINSYLT (LCDR1);  
LTNRLMD (LCDR2);  
LQYVDFPYT (LCDR3);  
SSAMS (HCDR1);  
TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); и  
LISPY (HCDR3).

В предпочтительном варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

DIKMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDGVPS

RFGSGSGQEFLLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGKTKVEIK,

и вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFFSSAMSWVRQAPGKLEWVATISSGGRSTY

YPDSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGLTVTVSS,

или аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью с ними.

В другом аспекте настоящее изобретение представляет собой антитело к TG2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие следующие последовательности CDR:

KASQDINSYLT (LCDR1);

RTNRLFD (LCDR2);

LQYDDFPYT (LCDR3);

SSAMS (HCDR1);

TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); и

LISLY (HCDR3).

В предпочтительном варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSGTDFFTISSLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFFGGGKLEIK или

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPS

RFGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFFGGGKTKVEIK,

и вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMSWVRQAPGKLEWVSTISVGGGK

YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGLTVTVSS,

или аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью с ними.

В предпочтительном варианте антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из следующих фрагментов: фрагмента Fv; Fab фрагмента и Fab-подобного фрагмента.

В другом предпочтительном варианте антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv или дисульфидно связанный фрагмент Fv.

В другом предпочтительном варианте антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab' фрагмент или F(ab)<sub>2</sub> фрагмент.

В предпочтительном варианте антитело представляет собой молекулу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Вариабельная область легкой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFFGGGKLEIK или

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFFGGGKLEIK

соответствует областям, находящимся в иллюстративном антителе АВ-1 (фиг. 7 и 18).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, включающую следующую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFFGGGKLEIK (AB-1\_VK) или

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFFGGGKLEIK (AB-1\_VK1).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, включающую следующую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSGTDFFTISSLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFFGGGKLEIK (hAB-1\_RKE); или

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFFGGGKTKVEIK (hAB-1\_RKJ).

Эти последовательности представляют собой гуманизированные варианты последовательностей легкой цепи АВ-1, приведенных выше.

Варибельная область тяжелой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYP  
 DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS или  
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYP  
 DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

соответствует областям, находящимся в иллюстративном антителе АВ-1 (фиг. 7 и 18).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, включающую следующую аминокислотную последовательность:

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYP  
 DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (АВ-  
 1\_VH).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, включающую следующую аминокислотную последовательность:

EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYYP  
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hАВ-  
 1\_RHA).

Данная последовательность представляет собой гуманизированный вариант последовательности тяжелой цепи АВ-1, приведенной выше.

Считают, что последовательности непосредственно предшествующих воплощений включают участки определения комплементарности варибельных областей легкой и тяжелой цепей иллюстративного антитела ВВ-7 (см. фиг. 19).

Варибельная область легкой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

AIKMTQSPSSMYASLGERVITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSR  
 FSGSGSQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе ВВ-7 (фиг. 19).

Варибельная область тяжелой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGII FSSSAMSWSVRQTPPEKRLEWVATISSGGRSTYYP  
 DSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDLSRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе ВВ-7 (фиг. 19).

Описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь следующие участки:

i) по меньшей мере одну варибельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

AIKMTQSPSSMYASLGERVITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSR  
 FSGSGSQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK; и

ii) по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGII FSSSAMSWSVRQTPPEKRLEWVATISSGGRSTYYP  
 DSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDLSRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS.

Далее описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь следующие участки:

i) по меньшей мере одну варибельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKSLIYLTNRLMDGVPSR  
 FSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGKVEIK или  
 DIKMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKTLIYLTNRLMDGVPSR  
 FSGSGSQEFLLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGKVEIK; и/или

ii) по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISSGGRSTYYP  
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS или  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGII FSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVATISSGGRSTYYP  
 DSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS.

Эти последовательности соответствуют гуманизированным вариантам антитела ВВ-7 (см. табл. 23,

24 и 24А).

Считают, что последовательности непосредственно предшествующих воплощений включают участки определения комплементарности переменных областей легкой и тяжелой цепей иллюстративного антитела DC-1 (см. фиг. 20).

Варибельная область легкой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

DITMTQSPSSIIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIIYLVNRLVDGVPSR  
FSGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе DC-1 (фиг. 20).

Варибельная область тяжелой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYP  
DSVKGRFTISRDNVKNLTLYLQSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQTTLVSS

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе DC-1 (фиг. 20).

Описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь следующие участки:

i) по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

DITMTQSPSSIIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIIYLVNRLVDGVPSR  
FSGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK; и

ii) по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYP  
DSVKGRFTISRDNVKNLTLYLQSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQTTLVSS.

Далее описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь следующие участки:

i) по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDVVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIIYLVNRLVDGVPSR  
FSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK или  
DITMTQSPSSLSASVGDVVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIIYLVNRLVDGVPSR  
FSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK; и/или

ii) по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTLSTHAMSWSVRQAPGKLEWVATISSGGRSTYYP  
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISTYWGQTLVTVSS или  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTLSTHAMSWSVRQAPGKLEWVATISSGGRSTYYP  
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYFCARLISTYWGQTLVTVSS.

Эти последовательности соответствуют гуманизированным вариантам DC-1, представленным в табл. 23, 24 и 24А.

Варибельная область легкой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSVDYMYWYQQKPGSSPRLIIYDTSNLAGVPPVRF  
SGSGSGTYSYSLTISRGAEDAATYYCQQWNSPSTFGAGTKLELK

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе DD-9 (фиг. 25).

Варибельная область тяжелой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKLEWLAHIYWDGDKRY  
NPSLKSRLITISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQTLVTVSA

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе DD-9 (фиг. 25).

Описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь следующие участки:

i) по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSVDYMYWYQQKPGSSPRLIIYDTSNLAGVPPVRF  
SGSGSGTYSYSLTISRGAEDAATYYCQQWNSPSTFGAGTKLELK;



и ii) по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRY

NPSLKSRLTISKDSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLTVTSA.

Переменная область легкой цепи, включающая следующую аминокислотную последовательность:

QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRF

SGSGSGTYSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе ДН-2 (фиг. 26).

Переменная область тяжелой цепи, включающую следующую аминокислотную последовательность:

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRY

NPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTSA

соответствует области, находящейся в иллюстративном антителе ДН-2 (фиг. 26).

Описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь следующие участки:

i) по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность

QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRF

SGSGSGTYSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK;

и ii) по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRY

NPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTSA.

Описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь следующие участки:

i) по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую любой из последовательностей VK, приведенных на любой из фиг. 18-28; и/или

ii) по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую любой из последовательностей VH, приведенных на любой из фиг. 18-28, либо ее фрагмент, вариант или производное.

Как указано выше, рассмотрено, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент может включать аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75% идентичностью одной или более из приведенных выше аминокислотных последовательностей, например по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью одной или более из аминокислотных последовательностей, указанных выше. Также рассмотрено, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более инсерций, делеций, консервативных замен и/или неконсервативных замен.

Описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, включающую следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK или

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK, или

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1\_VK), или

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1\_VK1), или

EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYCYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (hAB-1\_RKE), или

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSR

FSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK (hAB-1\_RKJ).

Описаны антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут иметь по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность:

```
EVQLEESGGGLVVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYP
DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDTAMYCYCAKLISLYWGQGTTLTVSS или
EVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYP
DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDTAMYCYCAKLISLYWGQGTTLTVSS, или
EVQLQESGGGLVVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYP
DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRSEDTAMYCYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-
1_VH), или
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYYP
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-
1_RHA).
```

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой или включать любое гуманизованное или химерное антитело, раскрытое в данном описании, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать любую из последовательностей, приведенных в табл. 14-24 и 24A, или состоять из них.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать интактное антитело или состоять из него. Альтернативно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может состоять по существу из интактного антитела. Под "состоять по существу из" авторы изобретения подразумевают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из участка интактного антитела, достаточного для проявления связывающей специфичности к TG2.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой неприродное антитело. Конечно, где антитело представляет собой природное антитело, оно предложено в изолированной форме (то есть отличающейся от той формы, в которой его обнаруживают в природе).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из следующих фрагментов: Fv фрагмента; Fab фрагмента и Fab-подобного фрагмента, или состоять из этого фрагмента. В следующем воплощении изобретения Fv фрагмента может представлять собой одноцепочечный Fv фрагмент или Fv фрагмент, связанный дисульфидной связью. В следующем воплощении Fab-подобный фрагмент может представлять собой Fab' фрагмент или F(ab)<sub>2</sub> фрагмент.

О том факте, что варибельный тяжелый (V<sub>H</sub>) и варибельный легкий (V<sub>L</sub>) домены антитела вовлечены в распознавание антигена, впервые узнали благодаря ранним экспериментам по расщеплению протеазами. Дополнительное подтверждение было найдено в результате "гуманизации" антител грызунов. Варибельные домены, имеющие происхождение от грызунов, могут быть слиты с константными доменами человеческого происхождения, так что полученное в результате антитело сохраняет антигенную специфичность родительского антитела грызунов (Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Антигенную специфичность придают варибельные домены, и она не зависит от константных доменов, как известно из экспериментов, в которые вовлечена бактериальная экспрессия фрагментов антител, которые все содержат варибельные домены. Эти молекулы включают Fab-подобные молекулы (Beter et al. (1988) Science 240, 1041); Fv молекулы (Skerra et al. (1988) Science 240, 1038); одноцепочечные Fv (ScFv) молекулы, где домены-партнеры V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> связаны посредством гибкого олигопептида (Bird et al. (1988) Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) и однодоменные антитела (dAb), включающие изолированные V домены или состоящие из них (Ward et al. (1989) Nature 341, 544). Общий обзор методов, вовлеченный в синтез фрагментов антител, сохраняющих сайты специфического связывания, приведен в Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

Таким образом, в термин "антигенсвязывающий фрагмент" авторы изобретения включают функциональный фрагмент антитела, способный к связыванию с TG2.

Иллюстративные антигенсвязывающие фрагменты могут быть выбраны из группы, состоящей из Fv фрагментов (например, одноцепочечных Fv и дисульфид-связанных Fv) и Fab-подобных фрагментов (например, Fab фрагментов, Fab' фрагментов и F(ab)<sub>2</sub> фрагментов).

В одном воплощении изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv.

Преимущества более вероятного применения фрагментов антител, чем полноразмерных антител, имеют множество аспектов. Меньший размер фрагментов может приводить к улучшенным фармакологическим свойствам, таким как лучшая проницаемость для солидной ткани. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fab, Fv, ScFv и dAb фрагменты антител, могут экспрессироваться и секретироваться из E. coli, что, таким образом, дает возможность простого получения больших количеств этих фрагментов.

Описаны модифицированные варианты антител и их антигенсвязывающих фрагментов, например модифицированные путем ковалентного присоединения полиэтиленгликоля или другого подходящего

полимера.

Особенно предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представлял собой рекомбинантную молекулу (то есть, где оно получено рекомбинантными способами).

Способы получения антител и фрагментов антител хорошо известны в данной области техники. Например, антитела могут быть получены любым из нескольких способов, в которых используют индукцию продуцирования молекул антитела *in vivo*, скрининг библиотек иммуноглобулинов (Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter et al., 1991, Nature 349:293-299) или образование молекул моноклонального антитела линиями клеток в культуре. Эти способы включают, но не ограничены ими, гибридомный метод, метод с использованием гибридом В-клеток человека и метод гибридом с использованием вируса Эпштейна-Барре (EBV; от англ. "Epstein-Barr virus") (Kohler et al., 1975, Nature 256:4950497; Kozbor et al., 1985, J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al., 1984, Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Антитело может представлять собой моноклональное антитело.

Подходящие моноклональные антитела к выбранным антигенам могут быть получены известными методами, например методами, описанными в кн. "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) и в кн. "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J.G.R. Hurrell (CRC Press, 1982), включенных в данное изобретение посредством ссылки. Иллюстративные моноклональные антитела по изобретению и подходящие способы их получения приведены ниже в разделе Примеров.

Фрагменты антитела могут быть также получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (см., например, кн. Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, включенную в данное изобретение посредством ссылки). Например, фрагменты антитела по настоящему изобретению могут быть получены путем протеолитического гидролиза антитела или путем экспрессии в *E. coli* или в клетках млекопитающих (например, в культуре клеток яичника китайского хомячка или в других системах экспрессии белка) ДНК, кодирующей фрагмент. Альтернативно, фрагменты антитела могут быть получены путем расщепления полноразмерного антитела пепсином или папаином традиционными способами.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой антитело человека или гуманизированное антитело.

Специалистам в данной области техники понятно, что для терапии или диагностики у человека можно применять гуманизированные антитела. Гуманизированные формы антител, отличающихся от антител человека (например, мышиных), представляют собой химерные антитела или фрагменты антител, имеющие минимальные участки, имеющие происхождение от антител, отличающихся от антител человека, сконструированные методами геной инженерии. Гуманизированные антитела включают антитела, в которых участки, определяющие комплементарность, антитела человека (антитела-реципиента), замещены остатками из участка, определяющего комплементарность, вида, отличающегося от человека (антитела-донора), такого как мышь, крыса или кролик, обладающего желаемой функциональностью. В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv антитела человека замещены соответствующими остатками, отличающимися от человека. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, не находящиеся ни в антителе-реципиенте, ни в импортированной последовательности участка, определяющего комплементарность, или каркасного участка. Как правило, гуманизированное антитело включает по существу все по меньшей мере из одного, и в характерном случае двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все участки, определяющие комплементарность, соответствуют участкам антитела, отличающегося от антитела человека, и все или по существу все из каркасных участков, соответствующих релевантной консенсус-последовательности человека. Оптимально гуманизированные антитела также включают, по меньшей мере, участок константной области антитела, такой как участок Fc, в характерном случае имеющий происхождение от антитела человека (см., например, статьи Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, включенные в данное изобретение посредством ссылки).

Способы гуманизации антител, отличающихся от антител человека, хорошо известны в данной области техники. Как правило, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, отличающегося от человека. Эти аминокислотные остатки, отличающиеся от последовательности человека, часто называемые импортированными остатками, в характерном случае взяты из импортированного вариабельного домена. Гуманизация может быть выполнена по существу, как описано (см., например, следующие документы: Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536; US 4816567, включенные в данное изобретение посредством ссылки), путем замены участков, определяющих комплементарность, человека соответствующими участками, определяющими комплементарность, грызуна. Соответственно такие гуманизированные антитела представляют собой химерные антитела, где по существу менее чем интактный вариабельный домен человека заменен соответствующей последовательностью от вида, отличающегося от человека. На практике гуманизированные антитела в характерном случае могут представлять собой антитела человека, в которых некоторые остатки участка, определяющего

комплементарность, и возможно некоторые остатки каркасного участка заменены остатками из аналогичных сайтов антител грызуна.

Антитела человека могут быть также идентифицированы с использованием различных методов, известных в данной области техники, включающих библиотеки фагового дисплея (см., например, следующие документы: Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al., 1985, In: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77; Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86-95, Soderlind et al., 2000, Nat Biotechnol 18:852-6 и WO 98/32845, включенные в данное изобретение посредством ссылки).

Термин "аминокислота", как используют в данном изобретении, включают двадцать стандартных, генетически кодируемых аминокислот и их соответствующие стереоизомеры в "D" форме (по сравнению с природной 'L' формой), омега-аминокислоты, другие природные аминокислоты, нестандартные аминокислоты (например,  $\alpha,\alpha$ -двузамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты и т.д.) и химически дериватизированные аминокислоты.

Когда аминокислота обозначена конкретно, как, например, "аланин" или "Ala" или "A", этот термин относится как к L-аланину, так и к D-аланину, если исключительно не указано иное. Другие нестандартные аминокислоты могут также представлять собой подходящие компоненты для полипептидов по настоящему изобретению, если желаемое функциональное свойство сохраняется полипептидом. Для представленных пептидов каждый кодируемый аминокислотный остаток, где это целесообразно, представлен в виде однобуквенного обозначения, соответствующего тривиальному названию стандартной аминокислоты.

Полипептиды, как определено в данном описании, включают L-аминокислоты или состоят из них.

Как только получены подходящие антитела, их можно тестировать на активность, такую как связывающая специфичность или биологическая активность антитела, например, с помощью ELISA, иммуногистохимии, проточной цитометрии, иммунопреципитации, Вестерн-блоттинга и т.д. Биологическую активность можно тестировать в различных анализах с регистрируемыми величинами для данного конкретного признака.

В следующем аспекте в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вышеуказанных аспектов изобретения и воплощениям изобретения, относящимся к любому из вышеуказанных аспектов.

Соответственно предложен изолированный полинуклеотид, включающий следующие нуклеотидные последовательности или состоящий из них:

i)

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTA  
TCACTTGCAAGGGCAGTCCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGG  
GAAATCTCCTAAGACCCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGG  
TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAG  
ATATGGGAATTTATATTGTCTACAGTATGATGACTTTCGGTACACGTTCCGGAGGGGGGAC  
CAAATGGAAATAAAA; и/или

ii)

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCC  
GGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCCGCAACCATTAGTGTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCA  
GACAGTGTGAAGGTCGCTTCCACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCCTCTATCTGC  
AAATGAACAGTCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAAACCTAATCAGTCT  
CTACTGGGGCCAAGGCACCCTCTCAGTCTCTCTCA.

Также предложен изолированный полинуклеотид, включающий любую из нуклеотидных последовательностей, представленных на любой из фиг. 18-28, или состоящий из них.

Предложен изолированный полинуклеотид, включающий следующие нуклеотидные последовательности или состоящий из них:

i)  
 GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCATCA  
 TCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTCCACAGAAACCAGG  
 AAAGTCTCCTAAGACCCATGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGG  
 TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTACTCACCATCAGCGGCTGGAACATGAAG  
 ATATGGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC  
 CAAGCTGGAATAAAA; и/или

ii)  
 GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCCTTGCCATGTCTTGGGTTCCGCAGACTCC  
 GGAAAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACTATTAGTAGTGGTGGTTCGTTCCACCTACTATCCA  
 GACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCGTCTCCAGAGACAGTCCAAGAACACCCSTATACCTGC  
 AAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAAACTAATCAGTCC  
 CТАCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

Предложен изолированный полинуклеотид, включающий следующие нуклеотидные последовательности или состоящий из них:

i)  
 GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTA  
 TCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTCCAGCAGAAACCAGG  
 GAAATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGG  
 TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAG  
 ATATGGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC  
 CAAGCTGGAATAAAA; и/или

ii)  
 GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCCGCAGACTCC  
 GGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTTCGTTCCACCTACTATCCA  
 GACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCSTATATCTGC  
 AACTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTAC  
 CТАCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

Предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению ингибировало активность TG2. Следовательно, предпочтительно, чтобы антитело по изобретению ингибировало ферментативную активность TG2, и, таким образом, предотвращало поперечное сшивание остатков лизина и глутамин с образованием Nε-(γ-глутамил)лизин-изодипептидных связей. Предпочтительно, чтобы ферментативная активность TG2 была прекращена полностью, но рассмотрено, что это ингибирование может представлять собой частичное ингибирование в тех случаях, где это частичное ингибирование достаточно для обеспечения полезного терапевтического или нетерапевтического результата. Специалист в данной области техники сможет определить, является ли степень ингибирования эффективной для достижения желаемого результата.

Предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладали специфичностью в отношении ингибирования TG2. Таким образом, предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не ингибировали активность TG1, TG3, TG13 и/или TG7. Рассмотрено, что антитело, эффективно ингибирующее активность TG2, но являющееся достаточно селективным, чтобы значимо не ингибировать активность TG1, TG3, TG13 и/или TG7, может быть особенно полезным в медицине. Таким образом, предпочтительно, чтобы антитело исключительно ингибировало активность TG2.

Описано также соединение, включающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому предшествующему аспекту и дополнительную группировку.

Дополнительная группировка может представлять собой непосредственно или опосредованно цитотоксическую группировку.

В выражение "непосредственно цитотоксическая" авторы изобретения включают такое значение, что данная группировка представляет собой группировку, обладающую собственной цитотоксичностью. В выражение "опосредованно цитотоксическая" авторы изобретения включают такое значение, что данная группировка представляет собой группировку, которая, хотя не обладает собственной цитотоксичностью, может индуцировать цитотоксичность, например, посредством ее действия на другую молекулу

или посредством дополнительного действия на эту группировку.

Цитотоксическая группировка может быть выбрана, но не ограничена ею, из группы, включающей непосредственно цитотоксический химиотерапевтический агент, непосредственно цитотоксический полипептид, группировку, способную преобразовывать относительно нетоксичное пролекарство в цитотоксическое лекарственное средство, радиосенсибилизатор, непосредственно цитотоксическую нуклеиновую кислоту, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую непосредственно или опосредованно цитотоксический полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический полипептид, или радиоактивный атом. Рассмотрено, что радиоактивный атом может представлять собой любой из следующих атомов: фосфора-32, йода-125, йода-131, индия-111, рения-186, рения-188 или иттрия-90.

Цитотоксические химиотерапевтические агенты, такие как противораковые агенты, включают следующие агенты: алкилирующие агенты, включающие хлорметины, такие как меклоретамин ( $\text{HN}_2$ ), циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан (L-сарколизин) и хлорамбуцил; этиленимины и метилмеламины, такие как гексаметилмеламин, тиотепа; алкилсульфонаты, такие как бусульфан; нитрозомочевины, такие как кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), семустин (метил-CCNU) и стрептозоцин (стрептозоцин); и триазены, такие как дакарбазин (DTIC; диметилтриазеноимидазол-карбоксамид); антиметаболиты, включающие аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат (аметоптерин); аналоги пиримидина, такие как фторурацил (5-фторурацил; 5-FU), флосуридин (фтордезоксифторуридин; FUDR) и цитарабин (цитозинарабинозид); и аналоги пурина и родственные ингибиторы, такие как меркаптопурин (6-меркаптопурин; 6-MP), тиогуанин (6-тиогуанин; TG) и пентостатин (2'-дезоксикоформин). Натуральные продукты включают винка-алкалоиды, такие как винбластин (VLB) и винкристин; эпиподофиллотоксины, такие как этопозид и тенипозид; антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубин (дауномицин; рубидомицин), доксорубин, блеомицин, пликамицин (митрамицин) и митомицин (митомицин C); ферменты, такие как L-аспарагиназа; и модификаторы биологического ответа, такие как интерферон-альфа. Дополнительные агенты включают координационные комплексы платины, такие как цисплатин (цис-DDP) и карбоплатин; антрацендион, такой как митоксантрон и антрациклин; замещенную мочевины, такую как гидроксимочевина; производное метилгидразина, такое как прокарбазин (N-метилгидразин, MH); и адренкортикальный супрессант, такой как митотан (o,p'-DDD) и аминоклутетимид; таксол и его аналоги/производные; и агонисты/антагонисты гормона, такие как флутамид и тамоксифен.

Различные агенты из числа этих агентов ранее присоединяли к антителам и другим агентам доставки в сайт-мишень, и поэтому соединения по изобретению, включающие эти агенты, могут быть легко получены специалистами в данной области техники. Например, для конъюгации ряда агентов, включающих доксорубин, с антителами можно использовать карбодимидную конъюгацию (Bauminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159; включена в данное изобретение посредством ссылки).

Цитотоксические пептидные или полипептидные группировки включают любую группировку, приводящую к клеточной гибели. Цитотоксические пептидные и полипептидные группировки хорошо известны в данной области техники и включают, например, ризин, абрин, экзотоксин *Pseudomonas*, тканевой фактор и тому подобное. Способы их сшивания с нацеливающими группировками, такими как антитела, также известны в данной области техники. Применение ризина в качестве цитотоксического агента раскрыто в статье Burrows & Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8996-9000, включенной в данное изобретение посредством ссылки, а применение тканевого фактора, приводящее к локализованному свертыванию крови и инфаркту опухоли, раскрыто в статьях Ran et al. (1998) *Cancer Res.* 58, 4646-4653 и Huang et al. (1997) *Science* 275, 547-550. В статье Tsai et al. (1995) *Dis. Colon Rectum* 38, 1067-1074, включенной в данное изобретение посредством ссылки, раскрыта цепь абрина А, конъюгированная с моноклональным антителом. Другие белки, инактивирующие рибосомы, раскрыты в качестве цитотоксических агентов в документе WO 96/06641. Экзотоксин *Pseudomonas* можно также применять в качестве цитотоксической пептидной группировки (см., например, статью Aiello et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10457-10461; включенную в данное изобретение посредством ссылки).

Некоторые цитокины, такие как фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ; от англ. "tumor necrosis factor") и интерлейкин (ИЛ)-2, могут быть также полезны в качестве цитотоксических агентов.

Некоторые радиоактивные атомы могут также быть цитотоксическими при доставке в достаточных дозах. Таким образом, цитотоксическая группировка может включать радиоактивный атом, который при его применении доставляет в сайт-мишень количество радиоактивности, достаточное для цитотоксичности. Подходящие радиоактивные атомы включают фосфор-32, йод-125, йод-131, индий-111, рений-186, рений-188 или итрий-90, либо любой другой изотоп, испускающий достаточно энергии, чтобы разрушать прилежащие клетки, органеллы или нуклеиновую кислоту. Предпочтительно изотопы и плотность радиоактивных атомов в соединении являются такими, чтобы в сайт-мишень была доставлена доза, составляющая более 4000 кГр (предпочтительно по меньшей мере 6000, 8000 или 10000 кГр), и предпочтительно в клетки сайта-мишени и их органеллы, в частности в ядро. Радиоактивный атом может быть присоединен к антителу известными путями. Например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или другой хелатирующий агент может быть присоединен к антителу и использован для присоединения  $^{111}\text{In}$  или  $^{90}\text{Y}$ . Остатки тирозина могут быть мечеными  $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$ .

Цитотоксическая группировка может представлять собой подходящий опосредованно цитотоксический полипептид. Цитотоксический полипептид представляет собой полипептид, обладающий ферментативной активностью, и может преобразовывать относительно нетоксичное пролекарство в цитотоксическое лекарственное средство. Когда нацеливающая группировка представляет собой антитело, систему данного типа часто называют направленной на антитела ферментно-пролекарственной терапией (ADEPT; от англ. "Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy"). Эта система требует, чтобы нацеливающая группировка была локализована на ферментном участке для желаемого сайта в организме пациента (то есть в сайте, экспрессирующем MR, таком как новая сосудистая ткань, ассоциированная с опухолью), а затем предоставления времени для локализации фермента в этом сайте, введения пролекарства, являющегося субстратом для фермента, где конечный продукт катализа представляет собой цитотоксическое соединение. Целью данного подхода является максимизация концентрации лекарственного средства в желаемом сайте и минимизация концентрации лекарственного средства в нормальных тканях (см. статьи Senter, P.D. et al. (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) Br. J. Cancer 56, 531-2; и Bagshawe, K.D. et al. (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" Br. J. Cancer. 58, 700-703).

Цитотоксическое вещество может представлять собой любое существующее противораковое лекарственное средство, такое как алкилирующий агент; агент, интеркалирующий в ДНК; агент, ингибирующий ключевые ферменты, такие как дигидрофолатредуктаза, тимидинсинтетаза, рибонуклеотидредуктаза, нуклеозидкиназы или топоизомераза; или агент, воздействующий на гибель клеток путем взаимодействия с любыми другими клеточными компонентами. Этопозид является примером ингибитора топоизомеразы.

Описанные пролекарственные системы включают следующие системы: пролекарство фенилизотиоцианат, активируемое  $\beta$ -глюкуронидазой *E. coli* (Wang et al., 1992 и Roffler et al., 1991); пролекарство доксорубина, активируемое  $\beta$ -глюкуронидазой человека (Bosslet et al., 1994); дополнительные пролекарства доксорубина, активируемые  $\alpha$ -галактозидазой кофейных зерен (Azoulay et al., 1995); пролекарства даунорубина, активируемые  $\alpha$ -D-галактозидазой кофейных зерен (Gesson et al., 1994); пролекарство 5-фторуридина, активируемое  $\beta$ -D-галактозидазой *E. coli* (Abraham et al., 1994); и пролекарства метотрексата (например, метотрексат-аланин), активируемые карбоксипептидазой А (Kuefner et al., 1990, Vitols et al., 1992 и Vitols et al., 1995). Эти и другие агенты включены в табл. 1.

Таблица 1

Фермент	Пролекарство
Карбоксипептидаза G2	Производные L-глутаминовой кислоты и бензойной кислоты изотиоцианатов, анилинизотиоцианатов, фенилизотиоцианатов и фенилендиаминизотиоцианатов; фторированные производные этих соединений
Щелочная фосфатаза	Этопозидфосфат
	Митомицинфосфат
Бета-глюкуронидаза	пара-гидроксианилинизотиоцианат-глюкуронид
	Эпирубицин-глюкуронид
Пенициллин-V-амидаза	Адриамицин-N-феноксиацетил
Пенициллин-G-амидаза	N-(4'-гидроксифенил-ацетил)палитоксин
	Доксорубин и мелфалан
Бета-лактамаза	Хлорметин-цефалоспорин пара-фенилендиамин; производные доксорубина; производное винбластин - цефалоспорина, цефалоспоринизотиоцианат; производное таксола
Бета-глюкозидаза	Цианофенилметил-бета-D-глюкопиранозидуроносовая кислота
Нитроредуктаза	5-(Азаридин-1-ил)-2,4-динитробензамид
Цитозиндеаминаза	5-Фторцитозин
Карбоксипептидаза А	Метотрексат-аланин

(Данная таблица адаптирована из статьи Bagshawe (1995) *Drug Dev. Res.* 34, 220-230, из которой могут быть получены полные ссылки на эти системы; производное таксола описано в статье Rodrigues, M.L. et al. (1995) *Chemistry & Biology* 2, 223.)

Подходящие ферменты для образования части ферментативного участка включают следующие ферменты: экзопептидазы, такие как карбоксипептидазы G, G1 и G2 (для глутамилированных пролекарств, представляющих собой изотиоцианатные пролекарства), карбоксипептидазы A и B (для пролекарств на основе метотрексата (MTX; от англ. "methotrexate") и аминоксипептидазы (для пролекарств на основе 2- $\alpha$ -аминоацил-МТС); эндопептидазы, такие как тромболизин (для тромбиновых пролекарств); гидролазы, такие как фосфатазы (например, щелочная фосфатаза) или сульфатазы (например, арилсульфатазы) (для фосфорилированных и сульфатированных пролекарств); амидазы, такие как пенициллинамидазы и ариллациламидаза; лактамазы, такие как  $\beta$ -лактамидазы; гликозидазы, такие как  $\beta$ -глюкуронидаза (для  $\beta$ -глюкуронимид-антрациклинов),  $\alpha$ -галактозидаза (для амигдалина) и  $\beta$ -галактозидаза (для  $\beta$ -галактозо-антрациклинов); деаминазы, такие как цитозиндеамидаза (для 5FC); киназы, такие как урокиназа и тимидинкиназа (для ганцикловира); редуктазы, такие как нитроредуктаза (для CB1954 и аналогов), азоредуктаза (для азобензолдиотиоцианатов) и DT-диафораза (для CB1954); оксидазы, такие как глюкозооксидаза (для глюкозы), ксантиноксидаза (для ксантина) и лактопероксидаза; DL-рацематы, каталитические антитела и циклодекстрины.

Пролекарство является относительно нетоксичным по сравнению с цитотоксическим лекарственным средством. В характерном случае оно обладает менее 10% токсичности, предпочтительно менее 1% токсичности, измеренной в подходящем тесте цитотоксичности *in vitro*. Вероятно, что группировка, способная к преобразованию пролекарства в цитотоксическое лекарственное средство, активная в изоляции от остальной части соединения, но единственным обязательным условием для нее является то, чтобы она обладала активностью, когда (а) она находится в комбинации с остальной частью соединения и (б) это соединение присоединено к клеткам-мишеням, находится вблизи них или интернализировано в клетках-мишенях.

Когда каждая группировка соединения представляет собой полипептид, две части могут быть связаны вместе любым из традиционных путей сшивания полипептидов, таких как в целом описаны в статье O'Sullivan et al. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 100-108. Альтернативно, это соединение может быть получено в виде слитого соединения с помощью методов рекомбинантных ДНК, где вся длина ДНК содержит соответствующие участки, кодирующие две группировки соединения по изобретению, либо примыкающие друг к другу, либо разделенные участком, кодирующим линкерный пептид, который не нарушает желаемые свойства соединения. Вероятно, эти два участка соединения могут перекрываться полностью или частично.

Цитотоксическая группировка может представлять собой радиосенсибилизатор. Радиосенсибилизаторы включают фторпиримидины, аналоги тимидина, гидроксимочевину, гемцитабин, флударабин, никотинамид, галогенированные пиримидины, 3-аминобензамид, 3-аминобензодиамид, этаниксадол, пимонидазол и мизонидазол (см., например, статьи McGinn et al. (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) *Invest. New Drugs* 14, 257-263; Horsman (1995) *Acta Oncol.* 34, 571-587; Shenoy & Singh (1992) *Clin. Invest.* 10, 533-551; Mitchell et al. (1989) *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 827-836; Iliakis & Kurtzman (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 1235-1241; Brown (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 987-993; Brown (1985) *Cancer* 55, 2222-2228).

Доставка генов в клетки также может приводить к их радиосенсибилизации, например доставка гена p53 или циклина D (Lang et al. (1998) *J. Neurosurg.* 89, 125-132; Coco Martin et al. (1999) *Cancer Res.* 59, 1134-1140).

Следующая группировка может представлять собой группировку, которая может стать цитотоксической или высвобождать цитотоксическую группировку при облучении. Например, изотоп бор-10 при соответствующем облучении высвобождает  $\alpha$ -частицы, являющиеся цитотоксическими (см., например, следующие документы: патент US 4348376 автора Goldenberg; Primus et al. (1996) *Bioconjug. Chem.* 7, 532-535).

Подобным образом, цитотоксическая группировка может представлять собой группировку, полезную в фотодинамической терапии, такую как фотофрин (см., например, Dougherty et al. (1998) *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889-905).

Цитотоксическая группировка может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, являющуюся непосредственно или опосредованно цитотоксической. Например, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой антисмысловой (антисенс) олигонуклеотид, который при локализации в сайте-мишени способен проникать в клетки и приводить к их гибели. Этот олигонуклеотид может, таким образом, представлять собой олигонуклеотид, предотвращающий экспрессию существенного гена, или олигонуклеотид, приводящий к изменению экспрессии гена, вызывающего апоптоз.

Примеры подходящих олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды, направленные на bcl-2 (Ziegler et al. (1997) *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1027-1036), на ДНК полимеразу  $\alpha$  и на топоизомеразу II $\alpha$  (Lee et al. (1996) *Anticancer Res.* 16, 1805-1811).



Пептидные нуклеиновые кислоты могут быть полезны вместо стандартных нуклеиновых кислот (см. статью Knudsen & Nielsen (1997) *Anticancer Drugs* 8, 113-118).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксическая группировка могут представлять собой полипептиды, являющиеся слитыми. Таким образом, описан полинуклеотид, кодирующий такое соединение.

Дополнительная группировка может представлять собой легко обнаружимую группировку. Рассмотрено, что эта легко обнаружимая группировка может содержать соответствующее количество любого из следующих элементов: йода-123, йода-131, индия-111, фтора-19, углерода-13, азота-15, кислорода-17, технеция-99т, гадолиния, марганца или железа.

В выражение "легко обнаружимая группировка" авторы изобретения включают значение, что данная группировка представляет собой группировку, которая при локализации в сайте-мишени после введения соединения по изобретению пациенту может быть обнаружена, в характерном случае неинвазивно вне организма и сайта-мишени, где она локализована. Таким образом, соединения полезны при визуализации и диагностике.

В характерном случае легко обнаружимая группировка представляет собой или включает радиоактивный атом, полезный при визуализации. Подходящие радиоактивные атомы включают технеций-99т или йод-123 для скинтиграфических исследований. Другие легко обнаружимые группировки включают, например, спин-метки для магнитно-резонансной визуализации (МРВ), такие как снова йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо. Ясно, что соединение должно иметь достаточно подходящих атомных изотопов, чтобы молекула была легко обнаружима.

Радио- или другие метки могут быть включены в соединение по изобретению известными путями. Например, если антитело представляет собой полипептид, оно может быть биосинтезировано или может быть синтезировано путем химического синтеза аминокислот, используя подходящие предшественники аминокислот, включающие, например, фтор-19 вместо атома водорода. Метки, такие как  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Rh}$ ,  $^{188}\text{Rh}$  и  $^{111}\text{In}$ , могут быть, например, присоединены посредством остатков цистеина в антителе. Иттрий-90 может быть присоединен посредством остатка лизина. Метод иодирования (Fraker et al. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80, 49-57) можно использовать для включения йода-123. В ссылке ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) подробно описаны другие способы.

Далее описан вектор, содержащий любой полинуклеотид по изобретению.

Характерные прокариотические векторные плазмиды представляют собой следующие плазмиды: pUC18, pUC19, pBR322 и pBR329, имеющиеся в продаже от фирмы Biorad Laboratories (Richmond, CA, USA); pTtc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5, имеющиеся в продаже от фирмы Pharmacia (Piscataway, NJ, USA); векторы pBS, векторы Phagescript, векторы Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, имеющиеся в продаже от фирмы Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA).

Характерная векторная плазида клеток млекопитающих представляет собой вектор pSVL, имеющийся в продаже от фирмы Pharmacia (Piscataway, NJ, USA). Примером индуцибельного экспрессионного вектора млекопитающих является вектор pMSG, также имеющийся в продаже от фирмы Pharmacia (Piscataway, NJ, USA).

Полезными дрожжевыми плазмидными векторами являются следующие векторы: pRS403-406 и pRS413-416, которые в целом имеющиеся в продаже от фирмы Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA). Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 представляют собой интегративные дрожжевые плазмиды (YIp) и включают дрожжевые селективные маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 представляют собой центромерные дрожжевые плазмиды (YCp).

Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность и, например, подходящие транскрипционные или трансляционные контролирующие последовательности, можно использовать способы, хорошо известные специалистам в данной области техники.

Далее предложена клетка-хозяин, содержащая любой полинуклеотид по изобретению или описанный вектор.

Известно множество экспрессионных систем, включая системы, в которых используют бактерии (например, *E. coli* и *Bacillus subtilis*), трансформированные, например, рекомбинантным бактериофагом, плазмидные или космидные экспрессионные ДНК-векторы; дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*), трансформированные, например, дрожжевые экспрессионные векторы; системы клеток насекомых, трансформированные, например, вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусом); системы растительных клеток, трансфицированных, например, вирусными или бактериальными экспрессионными векторами; системы клеток животных, трансформированных, например, аденовирусными экспрессионными векторами.

Векторы могут включать прокариотический репликон, такой как Col E1 ori, для размножения в прокариоте, даже если вектор нужно использовать для экспрессии в других, непроекариотических типах клеток. Векторы могут также включать подходящий промотор, такой как прокариотический промотор, способный направлять экспрессию (транскрипцию и трансляцию) генов в бактериальной клетке-хозяине, такой как *E. coli*, трансформированной этим вектором.

Промотор представляет собой элемент экспрессионного контроля, образованный последовательностью ДНК, который дает возможность связывания РНК полимеразы и прохождения транскрипции. Промоторные последовательности, совместимые с иллюстративными бактериальными хозяевами, в характерном случае представлены в плазмидных векторах, содержащих удобные сайты рестрикции для инсерции сегмента ДНК по настоящему изобретению.

Полинуклеотид в подходящей клетке-хозяине можно экспрессировать с получением антитела по изобретению или описанного соединения. Таким образом, полинуклеотид можно использовать в соответствии с известными методами, соответствующим образом модифицированными в свете идей, содержащихся в данном изобретении, для конструирования экспрессионного вектора, который затем используют для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и продуцирования антитела или соединения по изобретению. Такие методы включают методы, описанные в патентах US №№ 4440859; 4530901; 4582800; 4677063; 4678751; 4704362; 4710463; 4757006; 4766075 и 4810648, где все эти документы включены в данное изобретение посредством ссылки.

Полинуклеотид может быть соединен с широким разнообразием последовательностей ДНК для введения в подходящего хозяина. Сопутствующая ДНК зависит от природы хозяина, от способа введения ДНК в хозяина и от того, желательно ли поддержание ее в эписомном или в интегрированном состоянии.

Как правило, полинуклеотид встраивают в экспрессионный вектор, такой как плаزمид, в правильной ориентации и в соответствующей рамке считывания для экспрессии. При необходимости ДНК может быть связана с подходящими транскрипционными и трансляционными регуляторными контролирующими нуклеотидными последовательностями, распознаваемыми желаемым хозяином, хотя такие контролирующие последовательности, как правило, имеются в экспрессионном векторе. Таким образом, вставка ДНК может быть функционально связана с подходящим промотором. Бактериальные промоторы включают промоторы *E. coli* *lacI* и *lacZ*, промоторы T3 и T7, промотор *gpt*, промоторы PR и PL фага A, промотор *rhoA* и промотор *trp*. Эукариотические промоторы включают немедленно-ранний промотор CMV, промотор тимидинкиназы HSV, ранний и поздний промоторы SV40 ретровирусных длинных концевых повторов (ДКП). Другие подходящие промоторы известны специалистам в данной области техники. Экспрессионные конструкции желательно также содержат сайты инициации и терминации транскрипции, и в транскрибируемом участке сайт связывания рибосомы для трансляции. (Hastings et al., Международный патент № WO 98/16643, опубликованный 23 апреля 1998 г.).

Затем вектор вводят в хозяина стандартными методами. Как правило, не все из хозяев трансформируются вектором, и поэтому необходимо отбирать трансформированные клетки-хозяева. Один из методов отбора включает встраивание в экспрессионный вектор последовательности ДНК маркера с любым из необходимых контролирующих элементов, кодирующей селективный признак в трансформированной клетке. Эти маркеры включают гены устойчивости к дигидрофолатредуктазе, G418 или неомицину для культуры эукариотических клеток и к тетрациклину, канамицину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях. Альтернативно, ген для такого селективного признака может находиться на другом векторе, используемом для котрансформации желаемой клетки-хозяина.

Затем клетки-хозяева, трансформированные рекомбинантной ДНК по изобретению, культивируют в течение достаточного времени и в подходящих условиях, известных специалистам в данной области техники, в свете идей, раскрытых в данном изобретении, чтобы дать возможность экспрессии полипептида, который затем можно выделить.

Антитело или соединение можно выделить и очистить из культур рекомбинантных клеток хорошо известными способами, включающими осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и хроматографию на лектине. Наиболее предпочтительно для очистки используют высокоэффективную жидкостную хроматографию ("ВЭЖХ").

Кроме того, предложена стабильная линия клеток-хозяев, продуцирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предшествующих аспектов или описанное соединение, полученная в результате включения в линию клеток экзогенного полинуклеотида или вектора.

Клетка-хозяин может быть либо прокариотической, либо эукариотической. Бактериальные клетки являются предпочтительными прокариотическими клетками-хозяевами, и в характерном случае представляют собой штамм *Escherichia coli*, такой как, например, штаммы *E. coli* DH5, доступные из Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, и RR1, доступный из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC; от англ. "American Type Culture Collection") Rockville, MD, USA (No ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают клетки дрожжей и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как мышь, крыса, обезьяна, или линию фибробластов человека. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, в целом доступные из Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO; от англ. "Chinese hamster ovary"), доступные из ATCC как CCL61, эмбриональные клетки мыши Национального института здравоохранения Швейцарии (NIH Swiss; от англ. "Swiss National Health Institute") NIH/3T3, доступные из ATCC как CRL 1658, и клет-

ки почек обезьян COS-1, доступные из ATCC как CRL1650.

Кроме самих трансформированных клеток-хозяев, также рассмотрена культура этих клеток, предпочтительно моноклональная (клонально гомогенная) культура или культура, имеющая происхождение от моноклональной культуры, в питательной среде.

В следующем аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция/препарат, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому аспекту изобретения в смеси с фармацевтически приемлемым эксципиентом или адьювантом.

В "фармацевтически приемлемый" включают, что препарат является стерильным и апиrogenным. Подходящие фармацевтические носители хорошо известны в области фармацевтики. Носитель (носители) должны быть "приемлемыми" в том смысле, что они совместимы с соединением по изобретению и не вредны для их реципиентов. В характерном случае носители представляют собой воду или физиологический раствор, являющиеся стерильными и апиrogenными; тем не менее, можно использовать другие приемлемые носители.

Фармацевтическая композиция/препарат по изобретению может дополнительно содержать дополнительный активный ингредиент, то есть терапевтически активный агент, отличающийся от антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Рассмотрено, что один или более дополнительных активных агентов могут повышать эффективность фармацевтической композиции/препарата против целевого заболевания, если это целесообразно. Дополнительный активный ингредиент может представлять собой терапевтический агент, выбранный из агента, вовлеченного в уменьшение рубцевания ткани, уменьшения числа нейрофибриллярных клубков и/или снижение резистентности к химиотерапии.

В предпочтительном воплощении изобретения фармацевтическую композицию/препарат можно готовить для внутривенной, внутримышечной или подкожной доставки пациенту.

Предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция/препарат содержала количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, эффективное для лечения различных патологических состояний, описанных выше и дополнительно описанных ниже.

TG2 явно представляет собой многофункциональный фермент, связанный с рядом клеточных функций, включающих ядерную стабилизацию и транспорт [28, 29], эндоцитоз [30, 31], ГТФазную передачу сигнала [32-34], апоптоз [35, 36], клеточную адгезию [37-39], целостность цитоскелета [28, 29] и стабилизацию ВКМ [9]. Низкомолекулярный ингибитор может затруднять все эти функции, поскольку, как правило, он имеет свободный доступ во внеклеточное пространство и внутрь клетки. Антитело не может проникать в клетку, и, как таковое, TG2-специфичное антитело, введенное *in vivo*, не повлияет на внутриклеточные роли TG2.

Важно, что в большинстве патологических роли TG2, по-видимому, являются внеклеточными, например ее роль при рубцевании ткани и фиброзе, целиакии и раке. Следовательно, применение антитела, селективно связывающего TG2, в медицине вносит дополнительную степень селективности, предотвращающей нежелательные внутриклеточные эффекты, которые могут транслироваться в нежелательные побочные эффекты терапии.

Таким образом, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению обеспечивали бы клиническое преимущество по сравнению с ранее доступными лекарственными средствами, например, при блокировании TG2 при фибротических заболеваниях и заболеваниях, связанных с рубцеванием, где TG2 образует поперечные сшивки белков ВКМ, при целиакии, где глиадин деаμιдируется во внеклеточном пространстве, и при резистентности к химиотерапии при раке, где клеточная адгезия, по-видимому, является защитным фактором. Кроме того, малые фрагменты антитела по изобретению, например Fab фрагменты, могут проходить гематоэнцефалический барьер и ингибировать TG2 в головном мозге и потенциально обеспечат эффективные терапии для неврологических патологий с вовлеченностью в TG2.

Таким образом, в следующем аспекте изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому аспекту при получении лекарственного средства для снижения или ингибирования ферментативной активности TG2 у индивидуума, нуждающегося в этом.

В следующем аспекте изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому аспекту при получении лекарственного средства для лечения целиакии, аномального заживления раны, рубцевания, гипертрофированных рубцов, глазного рубцевания, воспалительного кишечного заболевания, макулярной дегенерации, псориаза, заболеваний, связанных с фиброзом, атеросклероза, рестеноза, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, нейродегенеративных/неврологических заболеваний, глиобластомы, злокачественных меланом, протоковых аденокарцином поджелудочной железы, миелоидного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, миелодиспластического синдрома, миелопролиферативного синдрома, саркомы Капоши, болезни Гансена, коллагенозного колита.

В следующем аспекте изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому аспекту при получении лекарственного средства для диагностики целиакии, аномального заживления раны, рубцевания, гипертрофированных рубцов, глазного рубцевания, воспалительного кишечного заболевания, макулярной дегенерации, псориаза, заболеваний, связанных с фибро-

зом, атеросклероза, рестеноза, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, нейродегенеративных/неврологических заболеваний, глиобластомы, злокачественных меланом, протоковых аденокарцином поджелудочной железы, миелоидного лейкоза, острого миелогенного лейкоза, миелодиспластического синдрома, миелопролиферативного синдрома, саркомы Капоши, болезни Гансена, коллагенозного колита.

В предпочтительном воплощении заболевание, связанное с фиброзом, представляет собой фиброз печени, фиброз легких, интерстициальную болезнь легких, фибротическую болезнь легких, сердечный фиброз, миелофиброз, фиброз почек, гломерулосклероз и тубулоинтерстициальный фиброз.

В предпочтительном воплощении нейродегенеративное/неврологическое заболевание представляет собой болезнь Гентингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, полиглутаминовое заболевание, спинобульбарную мышечную атрофию, дентаторубро-паллидолюисовую атрофию, спиноцереbellлярную атаксию 1, 2, 3, 6, 7 и 12, рубропаллидарную атрофию или спиноцереbellлярный паралич.

В "лечении" авторы изобретения включают как терапевтическое, так и профилактическое лечение субъекта/пациента. Термин "профилактическое" используют как включающий применение антитела, лекарственного средства, композиции, раскрытого в данном изобретении, которое либо предупреждает, либо снижает вероятность появления или развития патологического состояния или расстройства (такого как расстройство, связанное с фиброзом) у индивидуума.

Предпочтительно, чтобы пациент представлял собой человека, но пациент может представлять собой любое другое млекопитающее, которому может быть полезно это лечение. Например, пациент может представлять собой мышь, крысу, хомяка, кролика, кошку, собаку, козу, овцу, обезьяну или примата.

"Терапевтически эффективное количество", либо "эффективное количество", либо "терапевтический эффективный", как используют в данном изобретении, относится к такому количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект для данного состояния и режима введения. Это количество представляет собой predetermined количество активного вещества, вычисленное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимой добавкой и разбавителем, то есть носителем или основой для введения. Кроме того, подразумевают, что оно означает количество, достаточное для снижения или предупреждения клинически значимого дефицита активности, функции и ответа хозяина. Альтернативно, терапевтически эффективное количество является достаточным, чтобы вызвать улучшение в клинически значимом состоянии у хозяина, например млекопитающего.

Агенты (то есть антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, вариант, слияние или производное), лекарственные средства, фармацевтические композиции/препараты по изобретению можно доставлять, используя инъекционную систему доставки лекарственных средств пролонгированного высвобождения. Эти системы специально разработаны для снижения частоты инфекций. Примером такой системы является депо-препарат нутропина, который инкапсулирует рекомбинантный гормон роста человека (rhGH; от англ. "recombinant human growth hormone") в биоразлагаемых микросферах, который после инъекции высвобождает rhGH медленно в течение пролонгированного периода. Предпочтительно доставку осуществляют внутримышечно (i.m.) и/или подкожно (s.c.) и/или внутривенно (i.v.).

Агенты, лекарственные средства, фармацевтические композиции/препараты по изобретению можно вводить с помощью устройства, имплантируемого хирургическим путем, которое высвобождает лекарственное средство непосредственно в нужном сайте. Например, Vitrasert высвобождает ганцикловир непосредственно в глазу для лечения ретинита, вызванного цитомегаловирусом (CMV; от англ. "cytomegalovirus"). В результате непосредственного применения данного токсического агента в сайте заболевания достигается эффективная терапия без значительных системных побочных эффектов лекарственного средства.

Предпочтительно лекарственные средства и/или фармацевтические композиции/препараты по настоящему изобретению представляют собой стандартную дозу, содержащую суточную дозу или единицу, суточную субдозу или ее подходящую часть, активного ингредиента (ингредиентов).

Агенты, лекарственные средства, фармацевтические композиции по изобретению обычно вводят парентеральным путем, в форме фармацевтической композиции, содержащей активный ингредиент (ингредиенты), необязательно в форме нетоксичной органической или неорганической соли присоединения кислоты или основания, в фармацевтически приемлемой дозируемой форме. В зависимости от расстройства и от пациента, подлежащего лечению, а также от пути введения, композиции можно вводить в варьирующих дозах.

В терапии человека агенты, лекарственные средства, фармацевтические композиции/препараты по изобретению можно вводить отдельно, но, как правило, их вводят в смеси с подходящим фармацевтическим эксципиентом, разбавителем или носителем, выбранным с учетом предназначенного пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Агенты, лекарственные средства, фармацевтические композиции/препараты по изобретению можно вводить парентерально, например внутривенно, внутриартериально, интраперитонеально, подоболочечно, внутримышечно или подкожно, либо их можно вводить методами инфузии. Лучше всего применять их в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например достаточное количество солей или глюкозы, чтобы сделать этот раствор изотоническим с кровью. Водные

растворы при необходимости должны быть соответствующим образом забуферены (предпочтительно до рН от 3 до 9). Получение подходящих парентеральных препаратов в стерильных условиях легко выполняются стандартными фармацевтическими методами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Лекарственные средства и фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, делающие препарат изотоническим с кровью предназначенного реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители. Лекарственные средства и фармацевтические композиции могут быть представлены в контейнерах, содержащих однократные дозы или многократные дозы, например, в запаянных ампулах и флаконах, и их можно хранить в высушенном вымораживанием (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед применением. Инъекционные растворы и суспензии, приготовленные непосредственно перед применением, можно готовить из стерильных порошков, гранул и таблеток ранее описанного вида.

Для парентерального введения пациентам-людям уровень суточной дозы агентов, лекарственных средств и фармацевтических композиций по изобретению обычно составляет от 1 мкг до 10 мг на взрослого человека в сутки, где данное количество вводят в однократной дозе или в разделенных дозах. Врач в любом случае определит действительную дозировку, наиболее подходящую для любого индивидуально-го пациента, и она варьирует в зависимости от возраста, массы тела и ответа конкретного пациента. Приведенные выше дозировки являются иллюстративными для среднего случая. Конечно, могут быть индивидуальные случаи, где предпочтительны более высокие или более низкие диапазоны дозы, и такие случаи находятся в пределах объема изобретения.

В характерном случае лекарственные средства, фармацевтические композиции/препараты и наборы по изобретению содержат агент по изобретению при концентрации, составляющей от примерно 2 до 150 мг/мл или от примерно 2 до 200 мг/мл. В предпочтительном воплощении изобретения лекарственные средства, фармацевтические композиции/препараты и наборы по изобретению содержат агент по изобретению при концентрации 10 мг/мл.

Как правило, у людей парентеральное введение агентов, лекарственных средств, соединений, фармацевтических композиций/препаратов и наборов по изобретению является предпочтительным путем, поскольку он наиболее удобен.

Для ветеринарного применения агенты, лекарственные средства, фармацевтические композиции/препараты по изобретению вводят в виде надлежащим образом приемлемого препарата в соответствии с обычной ветеринарной практикой, и ветеринар определяет режим дозирования и путь введения, наиболее подходящий для конкретного животного.

Также описаны фармацевтические композиции/препараты, содержащие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты или основания связывающих группировок вышеописанного полипептида. Кислоты, используемые для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты упомянутых выше основных соединений, представляют собой кислоты, образующие нетоксичные соли присоединения кислоты, то есть соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, такие как среди прочего соли, представляющие собой гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, нитрат, сульфат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, ацетат, лактат, цитрат, кислый цитрат, тартрат, битартрат, сукцинат, малеат, фумарат, глюконат, сахарат, бензоат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, пара-толуолсульфонат и памоат [то есть 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)].

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания можно также использовать для получения фармацевтически приемлемых солевых форм агентов (то есть антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) согласно настоящему изобретению.

Химические основания, которые можно использовать в качестве реагентов для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения основания настоящих агентов, которые являются кислыми по природе. Представляют собой основания, образующие нетоксичные соли оснований с такими соединениями. Такие нетоксичные соли оснований включают, но не ограничены ими, среди прочего соли, образованные из таких фармакологически приемлемых катионов, таких как катионы щелочных металлов (например, калия и натрия) и катионы щелочноземельных металлов (например, кальция и магния), соли присоединения аммония или водорастворимого амина, такого как N-метилглюкамин (меглумин), и низшего алканоламмония, а также другие основные соли фармацевтически приемлемых органических аминов.

Агенты и/или полипептид-связывающие группировки могут быть лиофилизированы для хранения, и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Можно использовать любой подходящий способ лиофилизации (например, распылительную сушку, сушку центрифугированием) и/или методы восстановления. Специалистам в данной области техники понятно, что лиофилизация и восстановление могут привести к варьирующей степени потери активности антитела (например, для стандартных иммуноглобулинов антитела IgM склонны к большей потере активности, чем антитела IgG), и что может быть

необходимым регулировать уровни применения с повышением для ее компенсации. Лиофилизированная (высушенная вымораживанием) полипептид-связывающая группировка теряет не более чем примерно 20%, или не более чем примерно 25%, или не более чем примерно 30%, или не более чем примерно 35%, или не более чем примерно 40%, или не более чем примерно 45%, или не более чем примерно 50% ее активности (до лиофилизации) при регидратации.

Предложено антитело, соединение, фармацевтическая композиция/препарат, применение или способ, где эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от примерно 0,0001 до 50 мг/кг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Как понятно специалистам в данной области техники, точное количество соединения может варьировать в зависимости от его специфичной активности. Подходящие дозируемые количества могут содержать predetermined количество активной композиции, вычисленное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым разбавителем. В способах и применении для получения композиций по изобретению предложено терапевтически эффективное количество активного компонента. Терапевтически эффективное количество может быть определено обычным специалистом в медицине или ветеринаром на основании характеристик пациента, таких как возраст, масса, пол, состояние, осложнения, другие заболевания и т.д., как хорошо известно в данной области техники.

В следующем аспекте изобретения предложен способ *in vitro* снижения или ингибирования ферментативной активности TG2, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому аспекту в образец, содержащий TG2.

"Образец" может представлять собой любой образец, полученный из подходящего источника, например источника млекопитающего. Например, образец может представлять собой образец клетки или ткани, содержащий TG2. Иллюстративные ткани включают ткань, полученную из головного мозга, желудочно-кишечного тракта, легкого, поджелудочной железы, печени, кожи, почки, глаза, сердца, кровеносных сосудов, лимфатических узлов, спинного мозга и скелетной или гладкой мышцы пациента.

В следующем аспекте в изобретении предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вышеуказанных аспектов, включающий экспрессию соответствующего из вышеописанных полинуклеотидов.

Способ может быть выполнен, используя фаговый дисплей антител.

В "адьювант" авторы изобретения включают любой фармакологический или иммунологический агент, усиливающий иммунный ответ реципиента на полипептид по изобретению. Иммунологические адьюванты добавляют в вакцины для стимуляции ответа иммунной системы на антиген-мишень, но сам по себе не придает иммунитет. Примеры адьювантов включают масляные эмульсии, неорганические соединения, такие как соли алюминия, например гидроксид алюминия или фосфат алюминия, органические соединения, такие как сквален, виросомы или любое другое подходящее соединение или соединения, как понятно специалистам в данной области техники.

Как используют в данном изобретении, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явным образом не диктует иное. Так, например, ссылка на "антитело" включает множество таких антител, а ссылка на "дозу" включает ссылку на одну или более доз и их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и т.д.

Все документы, на которые ссылаются в данном изобретении, включены в него посредством ссылки.

Далее изобретение раскрыто более подробно путем ссылки на следующие неограничивающие графические материалы и "Примеры".

Фиг. 1 - получение рекомбинантного белка TG2 человека.

А: кДНК каталитического центрального участка TG2 получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с вектора pCIneo-hTG2 и встраивали в плазмиду pET 21a. После амплификации в *E. coli* эту кДНК расщепляли Nhe I и Hind III с высвобождением кДНК центрального участка TG2 и разделяли на 1% агарозном геле (дорожка 3). Размер полос определяли по сравнению с ДНК-маркером 100 п.о. (дорожка 1) и маркером молекулярной массы ДНК фага  $\lambda$  (дорожка 2).

В: вектор центрального участка TG2 pET21a использовали для трансформации штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL *E. coli*. Экспрессию индуцировали, используя изопропилтиогалактозид (ИПТГ) в течение 4 ч. Центральный белок TG2 образовывал нерастворимые тельца, которые выделяли из лизатов с помощью центрифугирования. Эти тельца повторно солибилизовали, и His-меченый центральный участок TG2 молекулярной массы 37 кДа очищали на колонке с никелем. 10 нг разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ), проводили Вестерн-блоттинг и гибридовали с зондом, представляющим собой антитело CUB7402 против TG2 (дорожка 2), по сравнению с точным маркером молекулярной массы Precision Plus (дорожка 1).

Фиг. 2 - иммунологический ответ у мышей на центральный белок rhTG2.

А: тестируемые образцы крови брали у 4 мышей, иммунизированных каталитическим центральным участком, на сутки 45 после первой иммунизации и 10 суток после второй бустер-иммунизации. Сыворотку серийно разводили, и реактивность проверяли с помощью ELISA против иммобилизованного центрального белка TG2.

В: реактивность дополнительно проверяли путем скрининга против rhTG2 человека и каталитического центрального домена rhTG2. 20, 40, 80 нг белка фракционировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и переносили с помощью Вестерн-блоттинга на поливинилиденфторидную (ПВДФ) мембрану. Эту мембрану подвергали иммунотестированию с разведением сыворотки 1:1000. Связывание антитела выявляли, используя  $\gamma$ -цепи, специфичную против мыши, меченую пероксидазой хрена (HRP; от англ. "horseradish peroxidase"). Для сравнения размера использовали точный маркер молекулярной массы Precision Plus.

Фиг. 3 - реактивность гибридомы против членов семейства TG.

А: анализ ELISA проводили, используя планшеты, покрытые рекомбинантными TG (100 нг/лунка), чтобы определить типоспецифичность к TG в 109 супернатантах гибридом, проявляющих высокую реактивность на TG2. Связывание антитела выявляли, используя  $\gamma$ -цепь, специфичную против мыши, меченую HRP. Показан случайный отбор гибридом, подвергнутых скринингу, включающих EF4, CG9 и FD8, которые показали перекрестную реактивность.

В: девять отобранных гибридов подвергали двойному клонированию. IgG очищали и тестировали на реактивность при 0,1 мкг/мл против рекомбинантных TG1, TG2, TG3, TG7 и Фактора XIIIa человека, используя анализ ELISA с планшетами, покрытыми 100 нг каждой TG. Данные представляют собой среднее значение оптической плотности (OD; от англ. "optical density") в 3 отдельных анализах ELISA  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM; от англ. "standard error of the mean").

Фактор XIIIa обозначен на графиках как TG13.

Фиг. 4 - идентификация гибридомы, обладающей ингибиторной активностью против TG2.

Кондиционированные среды из 32 лунок гибридом, обладающих специфичностью к TG2, подвергали скринингу на их действия на активность 100 нг rhTG2, используя анализ включения  $^3\text{H}$  путресцина. Химический универсальный ингибитор TG2 1,3-диметил-2-[(2-оксопропил)тио]имидазолия хлорид использовали в качестве положительного контроля на ингибирование. Среду RPMI (некондиционированную среду) использовали в качестве отрицательного контроля. 500 нг ингибиторного антитела к TG2, испытанного фирмой Quark Biotechnology, включали для сравнения. Данные представляют собой среднее число импульсов в 1 мин (cpm; от англ. "counts per minute"), включенное за 30 мин по меньшей мере от трех экспериментов, проведенных в двух повторах,  $\pm$ SEM. Столбики, выделенные серым цветом, показывают значимое ингибирование TG2 ( $p < 0,05$ ).

Фиг. 5 - картирование эпитопов ингибиторного антитела.

Каждое ингибиторное моноклональное антитело связывали с планшетом ELISA и подвергали пэннингу против фаговой библиотеки TG2 человека. Связывание фага с антителом спасали, амплифицировали и подвергали 4 дополнительным раундам пэннинга. Затем фрагменты библиотеки TG2 в фаге секвенировали, и перекрывающиеся последовательности использовали для определения эпитопа для каждого антитела. Затем последовательности, общие между антителами, использовали для определения консенсус-последовательности для конкретного ингибиторного эпитопа, и антитела группировали соответственно. Было идентифицировано 3 ингибиторных эпитопа.

Фиг. 6 - структурная локализация ингибиторных эпитопов в каталитическом центральном участке TG2.

Аминокислотную последовательность TG2 вводили в программу Rmol и создавали 3D-графическое изображение структуры в ее открытом,  $\text{Ca}^{2+}$  активированном состоянии с предполагаемыми сайтами связывания кальция (бирюзовый цвет) и каталитической триадой (серый цвет), показанной для сравнения (левая панель). Затем добавляли ингибиторные консенсус-эпитопы в синем цвете (антитело группы 1 - сайт AB1), красном цвете (антитело группы 2 - сайт DF4) и желтом цвете (антитело группы 3, сайт DD9).

Фиг. 7 - последовательность VL ингибиторных антител.

РНК из каждой ингибиторной гибридомы экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя вырожденные праймеры FR1, праймеры MH1 и MH2 и 3 праймера константной области для амплификации генов VH. Полученные в результате последовательности VH и VK показаны для AB1.

Фиг. 8 - эффективность AB1 при ингибировании активности TG2 в гомогенате клеток.

А: клетки Her2G подвергали лизису, и 45 мкг белка смешивали с 750 нг IgG от AB1, DH2, DD9, BV7, DC1 и EH6 в течение 20 мин. Затем эту смесь анализировали, используя анализ активности TG на основании включения  $^3\text{H}$  путресцина с отбором образцов через 1 ч. Скорость реакции вычисляли и выражали в виде процента того же лизата, проинкубированного со случайным антителом (MAB002). Данные представляют собой средний процент ингибирования  $\pm$  SEM от 2 отдельных экспериментов, проведенных в двух повторах. \*  $p < 0,05$ .

В: клетки HerG2 подвергали воздействию возрастающих концентраций глюкозы в течение 96 ч для повышающей регуляции экспрессии TG2. Клетки собирали, подвергали лизису, и 25 мкг лизата фракционировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, переносили с помощью Вестерн-блоттинга и подвергали иммунотестированию с раствором 1 нг/мл AB1 IgG, используя результат хемилюминесценции.

Фиг. 9 (табл. 1) - сравнительные значения  $IC_{50}$  для ингибиторных антител TG2.

Для определения значения  $IC_{50}$  для каждого антитела против человека, крысы и мыши использовали анализ  $^3H$  путресцина. 100 нг TG2 человека или 25 нг TG2 мыши и крысы использовали для постановки реакции, где примерно 3000 cpm путресцина было включено в час в 10 мкл реакционной смеси. Затем наносили серийные разведения каждого антитела, начиная с добавления в реакционную смесь 500 нг (конечная концентрация 5 мкг/мл), и инкубировали с TG2 в течение 20 мин перед активацией реакции. Значения  $IC_{50}$  вычисляли путем определения концентрации, при которой ферментативная скорость реакции была снижена на 50%, используя соответствующую кривую наилучшего приближения в программе Graphpad Prism. Значения выражены в виде количества IgG в мкг/мл в реакции, которое ингибировало бы 1 нг TG2.

Фиг. 10 - внеклеточная активность TG в клетках НК2 в ответ на ингибирование TG2.

Клетки НК2 высевали на фибронектин и инкубировали в течение 2 ч в присутствии 0,1 М биотинкадаверина либо с 4 нг/мкл антитела против TG2 человека (AB1) (часть А), либо с 4 нг/мкл антитела против TG2 человека (DC1) (часть В), либо с 400 мкМ сайт-специфического универсального ингибитора TG 1,3-диметил-2-[(2-оксипропил)тио]имидазолия хлорида. Внеклеточную активность TG измеряли на основании включения биотинкадаверина в фибронектин, где включение выявляли, используя экстравадин-HRP и субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Изменения оптической плотности измеряли при 450 нм в считывающем устройстве для 96-луночных планшетов. Данные представляют собой среднюю OD при 450 нм, скорректированную на 1 мг клеточного белка,  $n = 6$  лунок на экспериментальную группу.

Фиг. 11 - сравнение ингибирования TG2 антителом AB1 с ингибированием Fab фрагментом ингибиторного антитела к TG2 Quark, используя анализ включения  $^3H$  путресцина.

100 нг hTG2 анализировали на активность TG2 на основании включения  $^3H$  путресцина в диметилказеин в течение 60-минутного периода с добавлением либо 1 мкг Fab фрагмента антитела, раскрытого автором Quark в документе WO2006/100679 и синтезированного в Sheffield University, либо 500 нг AB1. Данные представляют собой среднюю активность TG в виде включения  $^3H$  путресцина (cpm)  $\pm$  SEM от 3 независимых экспериментов, проведенных в двух повторах.

Фиг. 12 - сравнение процента ингибирования TG2 антителом AB1 с ингибированием Fab фрагментом ингибиторного антитела к TG2 Quark, используя анализ включения  $^3H$  путресцина.

Данные из фиг. 11 альтернативно выражали в виде процента активности TG в каждый момент времени, чтобы выявить относительное сравнительное выключение активности TG2 в результате применения антитела AB1 и Fab фрагмента антитела Quark.

Фиг. 13 - сравнение ингибирования TG2 антителом AB1 с ингибированием рекомбинантным IgG крысы ингибиторного антитела TG2 Quark, используя анализ включения  $^3H$  путресцина.

100 нг hTG2 анализировали на активность TG2 на основании включения  $^3H$  путресцина в диметилказеин в течение 60-минутного периода с добавлением либо 500 нг рекомбинантного варианта ингибиторного антитела к TG2 крысы, раскрытого автором Quark в документе WO2006/100679 и синтезировано в Medical Research Council Technology, либо 500 нг AB1. Данные представляют собой среднюю активность TG в виде включения  $^3H$  путресцина (cpm)  $\pm$  SEM от 3 независимых экспериментов, проведенных в двух повторах.

Фиг. 14 - сравнение процента ингибирования TG2 антителом AB1 с ингибированием рекомбинантным IgG крысы ингибиторного антитела TG2 Quark, используя анализ включения  $^3H$  путресцина.

Данные из фиг. 13 альтернативно выражали в виде процента активности TG в каждый момент времени, чтобы выявить относительное сравнительное выключение активности TG2 в результате применения антитела AB1 и рекомбинантного IgG крысы Quark.

Фиг. 15 - действие AB1 на уровни ВКМ в клетках НК2.

Уровни зрелого коллагена в клетках НК-2 измеряли на основании включения  $^3H$  пролина в ВКМ в течение 76-часового периода либо с добавлением, либо без добавления ингибиторного антитела AB1 к TG2. данные представляют собой включение  $^3H$  пролина на мг клеточного белка, выраженное в виде процента среднего уровня в необработанных клетках  $\pm$  SEM.  $n=2$ .

Фиг. 16 - анализ ELISA связывания гуманизированных вариантов антител.

Супернатанты из клеток HEK293F, котрансфицированных различными комбинациями векторов гуманизированных легких цепей и тяжелой цепи, анализировали в анализе ELISA IgG против человека для определения концентрации в анализе ELISA против huTG2. Каждый супернатант анализировали в трех повторах и определяли значения  $IC_{50}$ . Наиболее эффективная комбинация была отобрана для дальнейшего исследования и в качестве гуманизированного антитела-кандидата.

Фиг. 17 - тестирование антитела MRC Quark CTD190 на TG2 человека с помощью ELISA.

В 96-луночные планшеты помещали hTG2 (1 мкг/мл) в карбонатном буфере в течение ночи, и обнаружение с помощью ELISA проводили, используя 100 нг/мл первого антитела. Обнаружение проводили, используя IgG против мыши (SIGMA 3673) для CUB и IgG против крысы (SIGMA A5795) для Quark (оба разведения 1:5000). Антитело Quark, полученное MRC T, реагирует с TG2 человека.

Фиг. 18 - РНК из гибридомы AB1 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифи-



цировали с помощью ПЦР, используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MHV4 с праймером константной области тяжелой цепи MHCG1, либо используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MKV4 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 19 - РНК из гибридомы BV7 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MHV4 с праймером константной области тяжелой цепи MHCG1, либо используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MKV4 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 20 - РНК из гибридомы DC1 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MHV4 с праймером константной области тяжелой цепи MHCG1, либо используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MKV4 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 21 - РНК из гибридомы JE12 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя 5' ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE-PCR) с праймером константной области тяжелой цепи MHCG1, либо используя праймер сигнальной последовательности MKV1 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 22 - РНК из гибридомы EN6 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя 5' RACE-PCR с праймером константной области тяжелой цепи MHCG2B, либо используя праймер сигнальной последовательности MKV с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 23 - РНК из гибридомы AG9 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MHV7 с праймером константной области тяжелой цепи MHCG1, либо используя смесь вырожденных праймеров сигнальной последовательности MKV1 - 11 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 24 - РНК из гибридомы AN3 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MHV7 с праймером константной области тяжелой цепи MHCG2B, либо используя праймер сигнальной последовательности с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 25 - РНК из гибридомы DD9 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя 5' RACE-PCR с праймером константной области тяжелой цепи MHCG2A, либо используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MKV5 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 26 - РНК из гибридомы DH2 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя 5' RACE-PCR с праймером константной области тяжелой цепи MHCG2B, либо используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MKV45 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 27 - РНК из гибридомы DD6 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя 5' RACE-PCR с праймером константной области тяжелой цепи MHCG2B, либо используя 5' RACE-PCR с праймером константной области легкой цепи лямбда MLC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VL.

Фиг. 28 - РНК из гибридомы IA12 экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя вырожденный праймер сигнальной последовательности MHV9 с праймером константной области тяжелой цепи MHCG1, либо используя вырожденный праймер сигнальной последовательности CL14 с праймером константной области легкой цепи каппа MKC. Представлены полученные в результате последовательности VH и VK.

Фиг. 29 - кривые доза-ответ и значение  $IC_{50}$  для ферментативного ингибирования рекомбинантной TG2 человека химерными антителами против TG2: (a) cAB003, (b) cBB001, (c) cDC001, (d) CDD9001, (e) cDH001 и (f) имеющимся в продаже антителом CUB7402 TG2. Значения  $IC_{50}$  представляют собой средние значения 3 независимых экспериментов.

Фиг. 30 - кривые доза-ответ и значения  $IC_{50}$  для ферментативного ингибирования рекомбинантной TG2 яванского макака химерными антителами против TG2: (a) CDC001 и (b) коммерческие антитело к TG2 CUB7402.

Фиг. 31 - кривые доза-ответ и значения  $IC_{50}$  для ферментативного ингибирования рекомбинантной TG2 человека гуманизированными антителами против TG2: (a) hBB001AA, (b) hBB001BB, (c) hAB005 и (d) hAB004.

Фиг. 32 - кривые доза-ответ и значения  $IC_{50}$  для ферментативного ингибирования рекомбинантной TG2 яванского макака гуманизированными антителами против TG2: (a) hBVCMAA и (b) hAB004.

Фиг. 33 - кривые доза-ответ и значения  $IC_{50}$  для ферментативного ингибирования рекомбинантной TG2 человека мышинными моноклиальными антителами против TG2: (a) mAB003, (b) mBV001, (c) mDC001, (d) mDD9001, (e) mDH001 и (f) mDD6001.

Фиг. 34 - анализ связывания ELISA гуманизированными вариантами антител AB1.

Супернатанты клеток HEK293F, котрансфицированных различными комбинациями векторов легких цепей гуманизированного AB1 и тяжелой цепи AB1 оценивали в анализе ELISA против IgG человека, чтобы определить концентрацию в анализе ELISA антитела против huTG2. Каждый супернатант анализировали в трех повторах и определяли значения  $IC_{50}$ . Наиболее эффективная комбинация была отобрана для дальнейших исследований и в качестве гуманизированного антитело-кандидата.

Фиг. 35 - кривые доза-ответ анализа связывания ELISA и данные  $EC_{50}$  для связывания следующих антител с TG2 человека: (a) химерных антител CDD9001, CDH001, CDC001, коммерческого антитела к TG2 CUB7402 и контроля, родственного по изотипу, (b) химерного антитела sBV001 и контроля, родственного по изотипу, и (c) химерного антитела sAB003 и контроля, родственного по изотипу.

Фиг. 36 - кривые доза-ответ анализа связывания ELISA и данные  $EC_{50}$  для связывания следующих антител с TG2 яванского макака: (a) химерных антител CDD9001, CDH001, CDC001, коммерческого антитела к TG2 CUB7402 и контроля, родственного по изотипу, (b) химерного антитела sBV001 и контроля, родственного по изотипу, и (c) химерного антитела sAB003 и контроля, родственного по изотипу.

Фиг. 37 - кривые доза-ответ анализа связывания ELISA и данные  $EC_{50}$  для связывания следующих антител с TG2 человека: (a) гуманизированных антител hBV001AA, hBV001BB, коммерческого антитела к TG2 CUB7402 и контроля, родственного по изотипу, и (b) гуманизированного антитела hAB004.

Фиг. 38 - кривые доза-ответ анализа связывания ELISA и данные  $EC_{50}$  для связывания следующих антител с TG2 яванского макака: (a) гуманизированных антител hBV001AA, hBV001BB, коммерческого антитела к TG2 CUB7402 и контроля, родственного по изотипу, и (b) гуманизированного антитела hAB004.

Фиг. 39 - связывающая активность гуманизированного AB1 с внеклеточным TG2.

Ингибирование активности внеклеточной TG2, продуцируемой клетками HK2, анализировали, используя измерение включения биотин-кадаверина в фибронектине с помощью ELISA. Показан пример кривой, показывающей ингибирование активности TG2 гуманизированным AB1 (hAB005) и полученное значение IC.

Фиг. 40 - связывающая активность гуманизированного BV7 с внеклеточным TG2.

Ингибирование активности внеклеточной TG2, продуцируемой клетками HK2, анализировали, используя измерение включения биотин-кадаверина в фибронектине с помощью ELISA. Показан пример кривой, показывающей ингибирование активности TG2 гуманизированным BV7 (hBV001AA и hBV001BB) и полученные значения IC.

Фиг. 41 - результаты контрольного анализа цитохалазина D, R281 и ZDON методом зарастания царапины и результаты анализа коммерческого антитела CUB7402 методом зарастания царапины

Анализ методом зарастания царапины проводили, используя клетки WI-38, после высевания и выращивания в течение ночи клетки промывали в среде без сыворотки и создавали царапину в монослое клеток, используя маркер царапины Essen Wound Maker. Среду удаляли и заменяли 95 мкл/лунка среды без сыворотки, содержащей контроля и тестируемые антитела. Планшет помещали в интерактивную систему для длительных клеточных исследований Essen InCuCyte, и зарастание царапины анализировали, используя программное обеспечение InCuCyte. Относительную плотность царапины наносили на график против времени для контролей цитохалазина D, R281 и Z-Dop (панель A) и коммерческого антитела CUB7402 и цитохалазина (панель B).

Фиг. 42 - результаты анализа гуманизированного BV7 методом зарастания царапины.

Анализ методом зарастания царапины проводили, используя клетки WI-38, после высевания и выращивания в течение ночи клетки промывали в среде без сыворотки и создавали царапину в монослое клеток, используя маркер царапины Essen Wound Maker. Среду удаляли и заменяли 95 мкл/лунка среды без сыворотки, содержащей контроля и тестируемые антитела. Планшет помещали в интерактивную систему для длительных клеточных исследований Essen InCuCyte, и зарастание царапины анализировали, используя программное обеспечение InCuCyte. Относительную плотность царапины наносили на график против времени для гуманизированного антитела hBV001AA и контроля цитохалазина D (панель A) и hBV001BB и контроля цитохалазина D (панель B).

Фиг. 43 - результаты анализа гуманизированного AB1 методом зарастания царапины.

Анализ методом зарастания царапины проводили, используя клетки WI-38, после высевания и выращивания в течение ночи клетки промывали в среде без сыворотки и создавали царапину в монослое клеток, используя маркер царапины Essen Wound Maker. Среду удаляли и заменяли 95 мкл/лунка среды без сыворотки, содержащей контроля и тестируемые антитела. Планшет помещали в интерактивную систему для длительных клеточных исследований Essen InCuCyte, и зарастание царапины анализировали, используя программное обеспечение InCuCyte. Относительную плотность царапины наносили на график

против времени для гуманизированного hAB005 и контроля цитохалазина D.

Фиг. 44 - результаты анализа химерного антитела DC1 методом зарастания царапины.

Анализы методом зарастания царапины проводили, используя клетки WI-38, после высевания и выращивания в течение ночи клетки промывали в среде без сыворотки и создавали царапину в монослое клеток, используя маркер царапины Essen Wound Maker. Среду удаляли и заменяли 95 мкл/лунка среды без сыворотки, содержащей контроли и тестируемые антитела. Планшет помещали в интерактивную систему для длительных клеточных исследований Essen IncuCyte, и зарастание царапины анализировали, используя программное обеспечение IncuCyte. Относительную плотность царапины наносили на график против времени для химерного антитела CDC001 и контроля цитохалазина D.

Фиг. 45 - связывание TG2 человека с иммобилизованным антителом cAB003 методом Biacore.

Фазы ассоциации введений TG2 человека на биосенсор, покрытый cAB003 при концентрации 25, 50, 100 и 200 нМ, включая введения в двух повторах при 50 нМ, показаны слева. Из того же эксперимента регистрировали две длительные фазы диссоциации, как показано справа. Совпадения показаны в виде сплошных черных линий, и результаты приведены в табл. 25.

Фиг. 46 - связывание TG2 яванского макака с иммобилизованным антителом hAB004 методом Biacore.

Фазы ассоциации введений TG2 яванского макака на биосенсор, покрытый hAB004, при концентрациях 25, 50, 100, 200 и 400 нМ, включая введения в двух повторах при 50 нМ, показаны слева. Из того же эксперимента регистрировали две длительные фазы диссоциации, как показано справа. Совпадения показаны в виде сплошных черных линий, и результаты приведены в табл. 26.

Фиг. 47 - связывание TG2 человека с иммобилизованным антителом CDH001 методом Biacore в отсутствие кальция.

Фазы ассоциации введений TG2 человека на биосенсор, покрытый CDH001, при концентрациях 25, 50, 100 и 200 нМ, включая введения в двух повторах при 50 нМ, показаны слева. Из того же эксперимента регистрировали две длительные фазы диссоциации, как показано справа. Совпадения показаны в виде сплошных черных линий, и результаты приведены в табл. 25.

Пример 1. Разработка ингибиторного антитела к TG2, подходящего для терапевтического применения у человека, с идентификацией 3 специфичных ингибиторных эпитопов.

Трансглутаминаза типа 2 (TG2) катализирует образование  $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутамил)-лизин-изопептидной связи между примыкающими пептидами или белками, включая пептиды или белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Повышенный уровень внеклеточной TG2 приводят к ускоренному депонированию и снижению клиренсу ВКМ, что лежит в основе рубцевания ткани и фиброза. Этот повышенный уровень также связан с целиакией, нейродегенеративными расстройствами и некоторыми раками. Хотя разработаны многочисленные соединения, ингибирующие трансглутаминазы, ни одно из них не обладает специфичностью к TG2 и до определенной степени ингибирует все трансглутаминазы. Хотя эти соединения дали возможность провести исследования обоснованности концепции о роли TG2 в этих патологиях, отсутствие специфичности к изоформе не позволяло применять их у человека. Чтобы решить эту проблему, авторы изобретения предприняли разработку высокоаффинного TG2-специфичного антитела, которое ингибировало бы активность только TG2.

Рекомбинантный белок, включающий аминокислоты 143-473 центрального участка TG2 человека, продуцировали в *Escherichia coli*, подвергали рефолдингу, и 100 мкг инъецировали 4 мышам с бустер-инъекциями через 2, 5, 7 и 10 недель.

Селезенки выделяли через 4 суток после последней бустер-инъекции, и спленоциты подвергали слиянию с клетками миеломы Sp2/0-Ag-14. Семьдесят пять супернатантов гибридом показали специфичность к TG2. Эти супернатанты гибридом подвергали скринингу на их способность к ингибированию активности TG2 в анализе включения путресцина, содержащем 100 мкг TG2. Десять TG2-специфичных супернатантов были ингибиторными. Затем их подвергали двойному клонированию. Используя фаговый дисплей для скрининга библиотеки фрагментов TG2, каждое антитело картировали до точных эпитопов центрального домена TG2 и определили 3 отдельных ингибиторных эпитопа. Было определено количество антитела для снижения активности 100 нг TG2 на 50%.

2 наиболее эффективных антитела, AB1 и DC1, связывались с аминокислотами 304-327 и имели  $IC_{50}$ , равную  $1,1 \times 10^{-5}$  мг/мл IgG на нг рекомбинантного TG2. Нанесение AB1 и DC1 было способно успешно ингибировать TG2 в клетках Hep2G человека и внеклеточную TG2 в клетках HK-2 человека при внесении в культуральную среду.

Таким образом, иммунизация мышей центральным доменом TG2 неожиданно обеспечивала образование моноклональных антител, нацеленных на ранее не описанные эпитопы в пределах каталитического центрального участка. Эти антитела являются специфичными, эффективно ингибируют активность TG2 и подходят для применения *in vivo*.

Материалы и методы.

Получение каталитического центрального домена трансглутаминазы 2.

Каталитический центральный домен TG2 человека (остатки Cys143 - Met 473 TG2) экспрессировали

ли, подвергали рефолдингу и очищали, чтобы дать возможность иммунизации у мышей. Каталитический центральный домен (смысловой (сенс)-праймер ПЦР: GCG CGC GCT AGC TGC CCA GCG GAT GCT GTG TAC CTG GAC, антисмысловой (антисенс)-праймер: GCG CGC AAG CTT CAT CCC TGT CTC CTC CTT CTC GGC CAG) клонировали в экспрессионном векторе pET21a(+) и экспрессировали в виде нерастворимых телец включения в штамме BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL E. coli (Agilent Technologies). Кратко, 50 мкл компетентных клеток BL21 (DE3) pLysS трансформировали 1 мкл экспрессионной плазмиды (30 нг/мкл) и высевали на чашки Петри с агаром Лурия-Бертани (LB), содержащим селективные антибиотики (100 мкг/мл ампициллина, 34 мкг/мл хлорамфеникола) и 1% глюкозу, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Отдельную колонию собирали и высевали в 10 мл свежей среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 34 мкг/мл хлорамфеникола и 1% глюкозы во встряхивателе-инкубаторе при 37°C и при 200 об/мин. После выращивания в течение ночи культуры переносили в 100 мл среды 2xYT с 1% глюкозой и выращивали до оптической плотности (OD)<sub>600 нм</sub> 0,8, а затем переносили в 1 л среды 2xYT до тех пор, пока OD<sub>600 нм</sub> снова не достигала 0,8. После 4 ч индукции 1 mM ИПТГ для стимуляции экспрессии, осаждали, и бактерии подвергали лизису путем обработки ультразвуком в буфере А (10 mM Трис; 1 mM этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); 10 mM дитиотрейтол (ДТТ); 1 mM фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ); 0,5 мг/мл таблеток ингибитора протеазы лизоцима (Roche), pH 8,0). Тельца включения собирали путем центрифугирования при 40000 × g и промывали три раза в отмывочном буфере В (50 mM Трис; 1 mM ЭДТА; 10 mM ДТТ; 2% деоксихолат натрия, pH 8,0), после чего подвергали конечной отмывке в деионизированной воде.

Тельца включения солиобилизовали в 3,5 мл буфера для ресолюбилизации (40 mM Трис-HCl, 8 M мочевины и 10 mM ДТТ, pH 12) и подвергали рефолдингу в течение 16-часового периода в буфере для рефолдинга (40 mM Трис-HCl; 150 mM NaCl; 20% глицерин; 5 mM цистеин; 0,5 mM цистин pH 8) при 4°C в темноте.

Ресолюбилизованные тельца включения наносили на колонку с никелем объемом 1 мл. Кратко, колонку предварительно уравнивали связывающим буфером (40 mM Трис; 300 mM NaCl; 10 mM имидазол) и наносили тельца включения. Колонку интенсивно промывали (40 mM Трис; 300 mM NaCl; 30 mM имидазол). Рекомбинантный белок элюировали высокой концентрацией имидазольного буфера (40 mM Трис; 300 mM NaCl; 300 mM имидазол). Элюированные фракции, содержащие белок, объединяли и подвергали диализу в течение ночи против подходящего буфера (40 mM Трис; 300 mM NaCl pH 8). Белок оценивали, используя анализ белка по Брэдфордлу.

Культура клеток и лизаты НерG2.

Клетки НерG2 были любезно предоставлены Richard Ross (University of Sheffield). Клетки рутинно выращивали при 37°C в 95% увлажненной атмосфере при 5% CO<sub>2</sub> в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; от англ. "Dulbecco modified Eagle's medium")/4,5 г на литр глюкозы, с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (ФСТ), 100 МЕ пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин (все компоненты от фирмы GIBCO). Два миллиона клеток высевали на 10 см чашки Петри и выращивали в течение 48 ч. Клетки подвергали лизису в 250 мкл буфера STE (0,32 M сахароза, 5 mM Трис, 1 mM EDTA, содержащем ингибиторы протеаз фенолметилсульфонилфторид (1 mM), бензамидин (5 mM) и лейпептин (10 мкг/мл) и обрабатывали ультразвуком на льду с получением клеточного лизата, полезного в анализе активности TG2.

Клетки почек человека 2 (HK2; от англ. "Human Kidney").

Клетки HK-2 (цилиндрический эпителий проксимального канальца почки) приобретали из Европейской коллекции клеточных культур, пассаж 3. Клетки рутинно выращивали при 37°C в 95% увлажненной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в среде без сыворотки для кератиноцитов (KSFМ, Gibco 17005-042) с L-глутамином, с добавлением рекомбинантного эпителиального фактора роста (EGF; от англ. "epithelium growth factor") (0,1-0,2 нг/мл) и экстракт бычьего гипофиза (20-30 мкг/мл). Для посева среду удаляли, и клетки промывали 1 × фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ), после чего трипсинизировали 1 мл 0,25% трипсин/ЭДТА (флакон T75) в течение 1 мин при 37°C. Клетки ресуспендировали в 10 мл KSFМ и центрифугировали при 400 g в течение 1 мин. Среду удаляли, и клетки высевали в KSFМ (нормальным является разделение от 1:3 до 1:5). Клетки использовали в эксперименте при пассажах 5-14. В характерном случае клетки выращивали до 95% конфлюентности.

Окрашивание Кумасси и Вестерн-блоттинг.

Чистоту рекомбинантных белков проверяли путем разделения 5 мкг выделенного белка на 10% (мас./об.) полиакриламидном денатурирующем геле и окрашивали раствором Кумасси бриллиантового синего R для окрашивания (Sigma).

Подтверждение синтеза центрального белка TG2, а также измерение уровней реактивности TG2 и центрального участка TG2 после иммунизации проводили с помощью Вестерн-блоттинга. Рекомбинантные белки (от 10 до 80 нг) наносили на 10% (мас./об.) полиакриламидный денатурирующий или не денатурирующий гель по необходимости и переносили на ПВДФ мембраны (Transblot SD, Biorad, UK) в течение 1 ч при 100 В. Мембраны блокировали в течение ночи при 4°C 3% (мас./об.) бычьим сывороточным альбумином (БСА) в солевом Трис-буфере (ТБС)/0,1% (об./об.) Твин 20. Затем мембраны промыва-

ли и подвергали иммунотестированию моноклиальными антителами мыши против трансклятаминазы в ТБС/Твин, содержащем 1% БСА. Для подтверждения рекомбинантного центрального белка TG2, и в качестве положительного контроля для скрининга антител использовали коммерческое антитело Cub7402 (Neomarkers) при разведении 1:1000. Связывание первого антитела обнаруживали с помощью второго антитела, представляющего собой гамма-цепь против мыши, сшитую с пероксидазой хрена (HRP) (Sigma, Poole, UK). Полосы визуализировали, используя хемиллюминесцентную систему обнаружения ECL (Amersham, UK).

Иммунизация мышей и слияние.

Каждую мышь иммунизировали смесью 50 мкг антигена (доведенного до объема 50 мкл стерильным ФСБ) и 50 мкл полного адьюванта Фрейнда. Инъекцировали четырех мышей (возраст 8-12 недель) BALB/C. Две бустер-иммунизации проводили (сутки 14 и 35), используя такой же протокол, за исключением того, что для этих инъекций использовали неполный адьювант Фрейнда. На сутки 45 у всех животных брали кровь для тестирования и оценивали на реактивность к TG2 с помощью ELISA.

Двух лучших респондеров подвергали дополнительной бустер-инъекции 100 мкг центрального белка (в ФСБ), снова смешанного с неполным адьювантом Фрейнда через 10 недель, и спустя 4 суток животных умерщвляли для выделения спленоцитов и слияния с клетками миеломы Sp2/0-Ag-14. Из данного слияния приблизительно 1000 лунок подвергали скринингу на реактивность к белку TG2 с помощью ELISA.

Скрининг на специфичность к TG2.

Кондиционированную среду и очищенный IgG тестировали на реактивность к членам семейства трансклятаминаз. Способность каждого из них к связыванию каждой трансклятаминазы (TG1, TG2, TG3, TG5, TG7 и Фактора XIIIa; все белки от фирмы Zedira) определяли, используя планшетный анализ связывания. Микротитрационные планшеты (Costar, Cambridge, UK) покрывали рекомбинантным TG (Zedira, Darmstadt, Germany) в 50 мкл 0,1 М бикарбонатного/карбонатного буфера (pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали в течение 2 ч при 37°C 200 мкл ФСБ, содержащего 3% мас./об. БСА. Планшеты промывали три раза ФСБ, содержащего 0,05% Твин 20 (отмывочный буфер), и добавляли 100 мкл разведенной кондиционированной среды (разведение от 1:5 до 1:20) или очищенные моноклональные антитела (mAb; от англ. "monoclonal antibodies") к каталитическому центральному участку TG2. Планшеты инкубировали еще в течение 1 ч при комнатной температуре. Стадию отмывки повторяли и добавляли гамма-цепь против мыши - пероксидазу хрена (1:5000) в ФСБ, содержащем 0,05% Твин 20 (об:об) и 1% БСА (мас.:об.) (Sigma, Poole UK) на 1 ч. После восьми отмывок связывание выявляли 50 мкл субстрата, представляющего собой 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Реакцию останавливали добавлением 25 мкл 0,1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и определяли поглощение при 450 нм.

Скрининг на ингибирование TG2.

Активность TG измеряют на основании Ca<sup>2+</sup> зависимого включения <sup>3</sup>H-путресцина в N',N'-диметилказеин. Рекомбинантную TG2 человека (100 нг) предварительно инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре с тестируемым образцом (кондиционированной средой или очищенным IgG) перед началом реакции. Для начала реакции добавляли двадцать пять мкл реакционной смеси (5 мкл 25 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мкл 40 мМ дитиотрейтола, 5 мкл смеси <sup>3</sup>H-путресцин и 10 мкл 25 мг/мл N',N'-диметилказеина (заменяют 25 мМ CaCl<sub>2</sub> 100 мМ EDTA для неферментативного контроля), и образцы инкубировали при 37°C в течение вплоть до 1 ч. Аликвоты по 10 мкл наносили в виде пятен на полосу фильтровальной бумаги Ватман 3 ММ и сразу погружали в охлажденную во льду 10% трихлоруксусную кислоту (ТХУ) с целью осаждения сшитых пептидов, в характерном случае на периоды 0, 10, 30 и 60 мин в ходе реакции. После трех интенсивных отмывок в охлажденной во льду 5% ТХУ с последующими 3 промывками в охлажденном во льду 95% этаноле фильтр, высушенный на воздухе, считали в 2 мл сцинтилляционной жидкости (Ultima Gold Packard, Perkin Elmer). Вычисляли скорость реакции. 1 единица TG эквивалента включению 1 нмоль путресцина в 1 ч при 37°C.

Такой же протокол использовали для оценки ингибирования TG в клеточных лизатах путем замены 25 мкл рекомбинантного белка 25 мкл клеточного лизата.

Клонирование гибридом и очистка антител из кондиционированной среды.

Выделение моноклонального антитела предпринимали из клонированных ингибиторных гибридом. Первоначально идентифицированные лунки, содержащие гибридомы, подвергали двойному клонированию способом ограничивающего разведения (чтобы гарантировать стабильность и клональность) в соответствии с традиционными способами (Loirat M.J. et al., 1992), где субклоны тестировали, как описано, с помощью ELISA и скринингов на активность. Отобранные клоны, продуцирующие антитело, размножали во флаконах на 25 и на 75 см<sup>2</sup> и подпитывали средой без сыворотки (Hyclone, Fisher Scientific, Loughborough, UK). По мере размножения клеток кондиционированную среду собирали для очистки IgG с использованием аффинной хроматографии на колонке с белком G (Amersham Life Sciences). Кондиционированную среду разводили в равном объеме 10 мМ фосфата натрия, pH 7,25, и наносили на колонку с белком G при скорости тока от 1,0 до 2,0 мл/мин. Колонку интенсивно промывали 10 объемами колонки того же буфера. Связанное антитело элюировали в растворе глицина (0,1 М; pH 2,7) и нейтрализовали

0,15% объема 1 М Трис/НСl рН 9. Образцы подвергали диализу против 1000 объемов фосфатно-солевого буферного раствора в течение 24 ч с 2 сменами буфера.

Картирование эпитопов антитела с помощью фагового дисплея.

Полноразмерную кодирующую последовательность TG2 человека амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции, используя следующие праймеры: TG2-FL-1 5' ATGGCCGAG-GAGCTGGTCTTAGAGA 3' и TG2-FL-2 5' GGCGGGGCCAATGATGACATTCGGGA 3'. Продукт амплификации длиной приблизительно 2 т.п.н. очищали, используя набор для очистки продуктов ПЦР Qiagen PCR cleanup (Qiagen), и расщепляли на случайные фрагменты, используя ДНКазу I RQ (Promega). ДНКазную реакцию RQ обрабатывали фрагментом Кленова ДНК полимеразы I и ДНК полимеразой T4 для получения фрагментов с тупыми концами. Эти фрагменты очищали с помощью гель-электрофореза, и фрагменты в диапазоне длины от 50-150 п.н. экстрагировали, используя набор для выделения фрагментов из геля Qiagen gel recovery (Qiagen, Crawley UK).

Вектор фагового дисплея расщепляли EcoRV, обрабатывали щелочной фосфатазой и очищали с помощью гель-электрофореза и набора Qiagen gel recovery. 100 нг очищенного вектора лигировали с 15 нг полученных фрагментов с тупыми концами кДНК TG2 человека. Полученную лигазную смесь вводили с помощью электропорации в электрокомпетентные клетки XL1-Blue (Agilent Technologies), и библиотеку фрагментов спасали с помощью хелперного фага VCSM13 (Agilent). Фаговые частицы осаждали 2% глюкозой и 4% ПЭГ 6000 и ресуспендировали в ФСБ с 0,1% Твин 20 (об.:об.) и 1% БСА (мас.:об.).

Картирование эпитопов выполняли, используя описанный ниже способ. Лунки ELISA покрывали в течение ночи при 4°C 30 мкг моноклонального антитела в 100 мкл покрывающего буфера. Покрытые лунки покрывали ФСБ/Твин и блокировали 400 мкл 3% БСА в ФСБ (мас.:об.) в течение 1 ч при комнатной температуре. В заблокированные лунки добавляли приблизительно  $10^{10}$  фаговых частиц (100 мкл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки промывали 8 раз 400 мкл ФСБ/0,5% Твин (об.:об), и прикрепленный фаг элюировали 0,2 М глицином рН 2,2. Элюированный фаг использовали для инфекции 1 мл хозяина XL1-Blue, и образцы высевали на агар LB (60 мкг/мл ампициллина, 15 мкг/мл тетрациклина), остальные клетки-хозяева высевали в 100 мл среды LB (60 мкг/мл ампициллина, 15 мкг/мл тетрациклина) и выращивали в течение ночи при 37°C во встряхивателе-инкубаторе при 200 об/мин с получением обогащенной библиотеки отобранных фрагментов. Данный способ обогащения повторяли 5 раз, и случайные колонии конечного раунда отбирали для секвенирования.

Определение последовательности области VL антитела.

Праймеры.

Сенс-праймеры тяжелой цепи.

Пару высоко вырожденных праймеров FR1, MH1 и MH2 (Wang et al. 2000), объединяли с 3 праймерами константной области для амплификации генов VH.

MH1 5' CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGTC 3'

MH2 5'CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3'

Mouse-G1 5'

AGGCGCAGTACTACAATCCCTGGGCACAATTTTCTTGTCCACC 3'

Mouse-G2a 5' AGGCGCAGTACTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG 3'

Mouse-G2b 5' AGGCGCAGTACTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGGCCCG

3'

Каппа-праймеры

VK1 5' CGCTGCGAGCTCGATATTGTGATGACBCAGDC 3'

VK2 5' CGCTGCGAGCTCGAGRRTTKTGATGACCCARAC 3'

VK3 5' CGCTGCGAGCTCGAAAATGTGCTCACCCAGTC 3'

VK4 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAGTC 3'

VK5 5' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACACAGAC 3'

VK6 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGCTSACYCARTC 3'

VK7 5' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACYCARTC 3'

VK8 5' CGCTGCGAGCTCCAAATTGTTCTCACCCAGTC 3'

K-CONST 5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA 3'

Суммарную РНК экстрагировали из моноклональных клеток гибридомы (примерно  $10^5$  клеток), используя Тризол (GIBCO) в соответствии с протоколом изготовителя и количественно определяли на основании  $A_{260 \text{ нм}}$ . кДНК синтезировали, используя обратную транскриптазу ImProm II (Promega) и случайные гексамерные праймеры. Реакционная смесь была следующей; 1 мкг суммарной РНК, 0,1 мкг олиго(dN)<sub>6</sub>, 12 мкл буфера ImProm II, 1 мкл 10 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) (Promega), 8 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 мкл обратной транскриптазы ImProm II (Promega), диэтилпирокарбонат (ДЭПК)-обработанная H<sub>2</sub>O до общего объема реакционной смеси, равного 60 мкл. РНК и смесь случайных праймеров нагревали до 70°C в течение 10 мин, а затем помещали на лед. Добавляли остальные компоненты реакционной смеси, а затем инкубировали при 20°C в течение 10 мин, затем при 40°C еще в течение 40

мин.

Аmplификацию генов VH и VK выполняли с полимеразой GoTaq (Promega). Каждая реакционная смесь на 50 мкл содержала следующие компоненты: кДНК 2 мкл, 20 пмоль сенс- и антисенс-праймеров, 10 мкл буфера реакции GoTaq, 1 мкл 10 mM dNTP, 5 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 ед. полимеразы GoTaq, H<sub>2</sub>O до конечного объема 50 мкл. Реакции проводили в виде 35 циклов, используя следующие условия: первоначальная денатурация 95°C 2 мин; денатурация 94°C 1 мин, отжиг 56°C 1 мин, элонгация 72°C 1 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза и клонировали, используя набор для клонирования TOPO TA (Invitrogen). Случайные минипрепараты продуктов ПЦР тяжелой и легкой цепи отбирали для секвенирования.

Измерение внеклеточной активности TG.

Внеклеточную активность TG измеряли с помощью модифицированного клеточного анализа ELISA. Эпителиальные клетки НК-2 собирали, используя 0,1 M ЭДТА или 0,25% трипсин/ЭДТА и высевали при плотности  $8 \times 10^4$  клеток/лунка в среде без сыворотки на 96-луночном планшете, который был покрыт в течение ночи 100 мкл/лунка фибронектина (5 мкг/мл в 50 mM Трис-НСl pH 7,4) (Sigma, Poole UK). Клеткам давали возможность прикрепиться в течение 2,5 ч при 37°C в присутствии 0,1 mM биотин-кадаверина [N-(5-аминопентил-биотинамид)трифторуксусная кислота] (Molecular Probes, Eugene OR, USA). Планшеты дважды промывали 3 mM ЭДТА/ФСБ, и клетки удаляли 0,1% (мас./об.) дезоксихолатом в 5 mM ЭДТА/ФСБ. Супернатант собирали и использовали для определения белка. Планшеты промывали 50 mM Трис-НСl, и включение биотин-кадаверина выявляли, используя 1:5000 экстравидин-HRP (Sigma, Poole, UK) в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим добавлением субстрата ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина). Реакцию останавливали 50 мкл 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и считывали поглощение при 450 нм.

Измерение уровней коллагена с помощью радиоактивного мечения.

Клетки высевали при плотности  $3,75 \times 10^6/10$  см<sup>2</sup> чашка Петри или  $1 \times 10^6$ /лунка 6-луночного планшета. Коллаген ВКМ оценивали путем мечения 20 мкКи <sup>3,4</sup>H-пролина (1,0 мКи/мл, ICN). Мечение выполняли в течение 72 ч в стандартных условиях культивирования клеток. После мечения среду удаляли, клетки промывали ФСБ и удаляли 2 мл 0,25 M гидроксида аммония в 50 mM Трис pH 7,4 при 37°C в течение 10 мин. Растворимую фракцию собирали, и концентрацию белка определяли, используя анализ с бицинониновой кислотой (БЦК). Чашки Петри интенсивно промывали возрастающими объемами ФСБ, после чего ВКМ солибилизировали 2 мл 2,5% (мас./об.) додецилсульфата натрия (ДСН) в 50 mM Трис pH 6,8. Чашку соскребали, чтобы гарантировать полное удаление ВКМ, и 200 мкл измеряли на радиоактивность в бета-сцинтилляционном счетчике. Счет корректировали на мг солибализированного клеточного белка и выражали в виде процента среднего значения контроля.

Получение рекомбинантного ратифицированного IgG Quark.

В экспериментальных целях было получено химерное антитело человека и крысы, состоящее из последовательности одноцепочечного Fv антитела человека против трансглутаминазы типа II человека. Это антитело названо QPCDTGII (сокращено до QCT), и последовательности его варибельных областей доступны из документа WO 2006/100679A2.

Подкласс  $\gamma 2a$  крысы отбирали на константные области тяжелой цепи, удаляя сайт гликозилирования, чтобы снизить вероятность реакции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) у тестируемых животных, представляющих собой крыс. Отобранная константная область крысы для тяжелой цепи представляла собой 013593 (Bruggemann, M. Gene 74: 473-482 (1988); Bruggemann, M., Free, J., Diamond, A., Howard, J., Cobbold, S. and Waldmann, H. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 6075-6079 (1986)) из базы данных Kabat (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., and Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH National Technical Information Service, 1991)). Константная область для легкой цепи каппа представляла собой 013718 (Sheppard, H.W. and Gutman, G.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7064-7068 (1981)) из базы данных Kabat.

Кратко, кодирующие последовательности тяжелой цепи и каппа-цепи были получены путем синтеза ДНК (использование кодонов было адаптировано для индекса случайности использования синонимичных кодонов в геноме млекопитающих).

Продукт синтеза генов тяжелой цепи амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры QCT\_HindIII и QCT\_H\_rev. Продукт ПЦР рестрицировали HindIII и NgoMIV и лигировали в экспрессионном векторе MRCT. Клоны компетентных бактерий DH5 $\alpha$ , химически трансформированных продуктом лигирования, подвергали ПЦР скринингу, используя праймеры HCMVi и rat\_gamma1. Три клона, образующие продукт ПЦР предсказанного размера, были секвенированы.

Продукт синтеза генов цепи каппа амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры QCT\_HindIII и QCT\_L\_rev. Продукт ПЦР рестрицировали HindIII и PpuMI и лигировали в экспрессионном векторе rKN100. Клоны компетентных бактерий DH5 $\alpha$ , химически трансформированных продуктом лигирования, подвергали ПЦР скринингу, используя праймеры HCMVi и rat\_kappa. Три клона, образующие продукт ПЦР предсказанного размера, были секвенированы.

Был получен экспрессионный вектор с двойной вставкой, кодирующий как тяжелую цепь, так и

цепь каппа, и этим вектором трансфицировали клетки НЕК293Т. Супернатанты клеточной культуры от двух крупномасштабных трансфекций НЕК293Т, объединяли и аффинно очищали на колонке объема 1 мл с агарозой с белком L, используя хроматографическую систему АКТА Explorer в соответствии с протоколами изготовителя. Единственный пик OD при 280 нм элюировали буфером для элюирования IgG и подвергали диализу против двух смен ФСБ. Этот элюат анализировали как с помощью поглощения в ультрафиолетовом свете (УФ) при 280 нм, так и с помощью ELISA на IgG<sub>2a</sub> крысы. Суммарный выход составлял приблизительно 700 мкг (по OD<sub>280 нм</sub>); 303,5 мкг (по ELISA).

Гуманизация антитела AB1.

Базы данных кДНК VH и VK человека.

Белковые последовательности иммуноглобулинов человека и мыши из Международной базы данных иммуногенетики (International Immunogenetics Database) 2009<sup>101</sup> и базы данных Kabat Database Release 5 of Sequences of Proteins of Immunological Interest (последнее обновление 17 ноября 1999)<sup>102</sup> использовали для составления базы данных последовательностей иммуноглобулинов человека при выравнивании по Kabat. База данных авторов изобретения содержит 10606 последовательностей VH и 2910 последовательностей VK.

Молекулярная модель AB1.

Модель гомологии варьируемых областей антитела мыши AB1 вычислена, используя программу Modeller program<sup>103</sup> в автоматическом режиме. Атомные координаты 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb и 1MQK.pdb представляли собой матрицы последовательностей наиболее высокой идентичности для Interface, VL и VH соответственно, как определено с помощью анализа Blast базы данных структур антител базы данных структур белка (pdb; от англ. "Protein Database") Accelrys. Эти матрицы использовали для создания 20 первоначальных моделей, лучшие из которых уточняли путем моделирования каждой петли участка CDR с его 3 лучшими матрицами петли.

Выбор каркасного участка hAB1.

Программу анализа последовательностей gibsSR применили для детального исследования баз данных VH и VK человека с белковыми последовательностями VHc, VKc и VKc<sub>1</sub> AB1, используя различные критерии отбора. Остатки каркасного участка (FW; от англ. "framework") в пределах 5Å остатка CDR (определение Kabat) в модели гомологии антитела мыши AB1 были идентифицированы и обозначены как остатки "приближенности 5Å".

Последовательность AF06220 была выбрана в качестве FW, на котором была основана исходная конструкция VHc гуманизованного AB1. В табл. 1 показано выравнивание и идентичность остатков AF06220 мышинового Ab1. В табл. 2 показан диапазон приближенности последовательностей 5Å. AF062260 имеет только 1 соматическую мутацию по сравнению с его геном VH зародышевой линии Z12347 (табл. 3).

Последовательность AY247656 была выбрана в качестве FW, на котором была основана исходная конструкция VKc гуманизованного AB1. Выравнивание и идентичность остатков мышинового AB1 показаны в табл. 4; в табл. 5 показан диапазон приближенности последовательностей 5Å. Это последовательность показала 5 соматических мутаций по сравнению с геном VK зародышевой линии X93620 (табл. 6).

Последовательность AF193851 была выбрана в качестве FW, на котором была основана исходная конструкция VKc<sub>1</sub> AB1. Выравнивание и идентичность остатков мышинового AB1 показаны в табл. 7. В табл. 8 показан диапазон приближенности последовательностей 5Å. Эта последовательность не проявляет соматических мутаций по сравнению с геном VK зародышевой линии J00248 (табл. 9).

Анализ связывания ELISA.

Клетки НЕК 293F котрансфицировали комбинациями различных векторов гуманизованной легкой цепи в соответствии с различными векторами гуманизованной тяжелой цепи. Рекомбинантную TG2 человека использовали для измерения связывания антитела с помощью ELISA. Результаты показали, что вариант RHA тяжелой цепи (табл. 10) в комбинации с любым из вариантов легкой цепи RKE и RKJ (табл. 11) (представляющие собой различные гуманизованные варианты легкой цепи) проявлял оптимальное связывание (фиг. 16).

Вариант RHA тяжелой цепи представляет собой немодифицированное прививание участков CDR мышинового антитела AB1 на донорную последовательность человека. Тем не менее, оба варианта легкой цепи RKE и RKJ имеют одну и ту же единственную обратную мутацию, находящуюся в приближенности 5Å, F72 (нумерация Kabat, показана зеленым цветом). Эта обратная мутация находится снаружи от остатков Vernier<sup>104</sup>, Canonical<sup>105</sup> или Interface<sup>106</sup> (см. табл. 11).





Таблица 8

	Остатки приближенности 5А
AB_VKc	DIQMTQTCTWFTLLIYGVVPSGSGSGQDFFYCFG
AF193851	.....S.....T..T....

Таблица 9

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
J00248.seq	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVITTCRASQG	ISNYLAWFQQK	PKGKPKSLIYAASSLQ	SGVPSRFS	SGSGSGTDF	FLTISLQ	PFEDFATYYC	QQYNSYFP
AF193851.seq	.....R.....	.....N.....	.....H.T..W	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Таблица 10

Номера по Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Vernier <sup>1</sup>	..*	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Canonical <sup>2</sup>	..1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Interface <sup>3</sup>	I..I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Прибл. 5А	****	**	****	***	***	*****	*	*		
AB_Vhc	-EVQLMDSGGGLVPRGSGSLKLSCAASGFTLSSAMS--WVRQTPDRRLEWVATI SV--GGKTYYPDSVGRFTISRDNKNTLYLQMSLRSSTAMY YCAKLI-----SLYWGQGLTVSS									
AB_RHA	-EVQLMDSGGGLVPRGSGSLKLSCAASGFTLSSAMS--WVRQAPKGLWEVSTI SV--GGKTYYPDSVGRFTISRDNKNTLYLQMSLRSSTAMY YCAKLI-----SLYWGQGLTVSS									

Таблица 11

Номера по Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Vernier <sup>1</sup>	..*	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Canonical <sup>2</sup>	..1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Interface <sup>3</sup>	I..I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Прибл. 5А	*****	**	**	**	***	*****	**	**		
AB_VKc	-EIVLTQSPFSMNASLGERVITTCASQ-----DINSVLTWYQQKPKGKPKSLIYRTNRLFQGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQ YDDFP-----YTFGGGTKLEI-K									
AB_RKE	-EIVLTQSPSSLSASVGDVITTCASQ-----DINSVLTWYQQKPKGKPKSLIYRTNRLFQGVPSRFSGSGSGTDFFFFTISLQPFDPGTYYCLQ YDDFP-----YTFGGGTKLEI-K									
AB_RKJ	-DIQMTQSPSSLSASVGDVITTCASQ-----DINSVLTWYQQKPKGKPKSLIYRTNRLFQGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPFEDFATYYCLQ YDDFP-----YTFGGGTKLEI-K									

Результаты

Получение центрального белка rhTG2.

Чтобы усилить образование антител, которые были бы с большей вероятностью нацелены на эпитопы, критические для активности TG2, чем на благоприятные сайты на молекуле TG2, авторы изобретения иммунизировали мышей вероятнее каталитическим центральным участком TG2, чем полноразмерной молекулой TG2. Для получения рекомбинантного домена TG2 была получена конструкция ПЦР, проходящей от основания 329 до основания 1419, и встроена в вектор Pet21+(a) (фиг. 1А). Внедрение и экспрессия данного вектора в бактериях BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL привели в результате к образованию нерастворимого белка протяженностью от аминокислоты 143 до 473, включающей весь каталитический центральный участок. Данный белок солюбилизировали и подвергали рефолдингу в 40 мМ Трис HCl; 150 мМ NaCl; 20% глицерин; 5 мМ цистеин; 0,5 мМ цистин рН 8. 10 нг этого белка разделяли с помощью электрофореза в невозстанавливаемом полиакриламидном геле, переносили с помощью Вестерн-блоттинга и подвергали иммунотестированию CUB7402. При 37 кДа была видна четкая полоса, соответствующая предсказанному размеру центрального участка TG2 (фиг. 1В). Полосы большего размера, также обладающие иммунореактивностью с CUB7402, вероятнее всего, представляют собой агрегаты центрального белка, поскольку они отсутствуют при разделении на восстанавливаемом геле (данные не представлены).

Иммунизация и слияние.

Четырех мышей иммунизировали 50 мкг центрального участка rhTG2. приблизительно на пятой и девятой неделе после иммунизации от каждой мыши брали образец сыворотки и тестировали на реактивность против rhTG2 с помощью ELISA, используя серийное разведение сыворотки. Все мыши показали сильную иммунную реакцию на центральный участок rhTG2, даже при самом высоком используемом разведении (1:51000) (фиг. 2А). Чтобы подтвердить, что антитела также распознают полноразмерный TG2, rhTG2 и центральный белок rhTG2 разделяли на не денатурирующем геле, переносили с помощью Вестерн-блоттинга и подвергали иммунотестированию разведением мышинной сыворотки 1:1000 (фиг. 2В). Мышь, обладающую самой сильной реактивностью (мышь С) против обоих белков, подверга-

ли бустер-инъекции, и спленоциты выделяли для слияния, используя University of Sheffield's Hybridoma service, Bioserv.

Отбор положительных гибридом и клонирование.

Из 400 лунок гибридом, отобранных Bioserv как самые высокие положительные, супернатанты из 109 показали постоянную реактивность к TG2, тем не менее, только 34 не реагировали на другие ключевые члены семейства TG при тестировании в ELISA (репрезентативные примеры представлены на фиг. 3A). Супернатант гибридом, специфичных к TG2, подвергли скринингу с помощью анализа включения  $^3\text{H}$ -путресцина на способность к ингибированию активности TG2 в результате 100 нг TG2 (фиг. 4). Этот первоначальный скрининг показал, что 10 супернатантов гибридом обладало способностью к ингибированию активности TG2 (AB1; DC1; BB7; EH6; DH2; DD9; JE12; AG9; AH3; DF4). Девять из десяти были успешно клонированы путем ограничивающего разведения. Для клона DF4, хотя клоны были выделены после клонирования, они по-видимому, не являлись ингибиторными. После клонирования IgG очищали из каждой клонированной гибридомы и повторно тестировали на селективную реактивность к TG2 (фиг. 3B).

Ингибиторный потенциал TG2.

Для каждой клонированной гибридомы IgG протестирован на ингибиторную активность в отношении TG2 против TG2 человека, крысы и мыши, и вычислено значение  $\text{IC}_{50}$  на основании количества IgG, необходимого для ингибирования 1 нг TG2. Значения  $\text{IC}_{50}$  против TG2 человека находились в 12-кратном диапазоне от наиболее эффективного AB-1 при  $1,1 \times 10^{-5}$  мг/мл IgG до наименее эффективного JE12 при  $12,3 \times 1,1 \times 10^{-5}$  мг/мл IgG (фиг. 9; табл. 1). Интересно, что авторы изобретения смогли определить  $\text{IC}_{50}$  только для 4 антител (DH2, DD9, EH6 и BB7), где против TG2 лучшим было антитело DH2, имеющее  $\text{IC}_{50}$   $2,23 \times 10^{-4}$  мг/мл IgG, являющееся приблизительно в 6 раз менее активным, чем против TG2 человека, и сравнительно в 38 раз менее активным, чем лучший ингибитор AB-1 против TG2 (фиг. 9; табл. 1). Ни одно из этих ингибиторных антител не обладало способностью к ингибированию TG2 мыши, вероятно, за счет иммунной толерантности.

Картирование эпитопов ингибиторных антител.

Чтобы установить, какие эпитопы в TG2 были иммунологически уникальными для TG2, при этом являясь ингибиторными, а также установить, нацелены ли эти 10 антител на один и тот же или на различные сайты, каждое антитело было картировано, используя Фаговый дисплей. Конструировали фаговую библиотеку TG2 и подвергали пэннингу против каждого mAb. Затем эпитоп определяли путем консенсус-секвенирования связывающих фагов.

Все антитела AB1, AG1, AH1, BB7, DC1, EH6 и JE12 оказались полностью или частично связывающими один эпитоп (фиг. 5), включающий аминокислоты 304-326 и, по-видимому, расположен перед активным центром внутри кармана, связывающего субстрат (фиг. 6). Данный участок авторы изобретения назвали сайтом AB-1, и назвали антитела, нацеленные на этот сайт, антителами группы 1.

Антитело DF4 уникально нацелен на последовательность, продолжающуюся от аминокислоты 351 до 365 (фиг. 5), идущую спереди назад центрального участка, включая Asp 358 в каталитической триаде (фиг. 6). Это антитело авторы изобретения назвали группой 2.

Антитела DH2 и DD9 связывались с последовательностью, покрывающей аминокислоты 450-467 (фиг. 5). Эти антитела группы 3 связываются с участком в задней части центрального участка вблизи соединения с р-складчатым доменом 1, который авторы изобретения назвали сайтом DH2. Этот эпитоп охватывает предполагаемый сайт связывания кальция (фиг. 6).

Секвенирование антитела.

С целью установления последовательности вариабельной легкой цепи для каждого антитела РНК из каждой ингибиторной гибридомы экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью ПЦР, используя пару высоко вырожденных праймеров FR1, MH1 и MH2, при объединении с 3 праймерами на константную область для амплификации генов VH.

Полученные в результате последовательности VH и VK показаны на фиг. 7 для AB1.

Способность AB1 к ингибированию активности TG2 в смеси белков *in vitro*.

Наиболее эффективным ингибиторным антителом против рекомбинантной TG2 является AB1. Чтобы обладать терапевтической ценностью, оно должно обладать способностью к ингибированию активности TG2 не только в чистом растворе, но также в сложном белковом растворе, и никоим образом не связываться с другими белками. Чтобы проверить это, был получен гомогенат линии гепатоцитов человека HepG2. Нанесение 0,5 мкг AB1 было способно ингибировать 70% активности TG2 (фиг. 8A). Тем не менее, BB7 производило значительно лучшее выключение активности TG2 на 90%. Иммунотестирование 25 мкг этого лизата с AB1 показало отсутствие нецелевого связывания с отдельной иммунореактивной полосой размера, соответствующего TG2 (фиг. 8B).

Способность AB1 и DC1 к ингибированию внеклеточной активности TG2.

Чтобы оценить, могут ли эти антитела ингибировать активность TG2 в клеточной системе. AB1 (фиг. 10a) и DC1 (фиг. 10b) наносили на клетки цилиндрического эпителия почек человека 2 (HK-2) в культуре и анализировали активность внеклеточной TG, используя анализ с использованием биотин-

кадаверина. АВ1 было способно достигать 60% ингибирования, а DC1 55% ингибирования активности при нанесении в культуральную среду 4 нг/мкл, что было сравнимо с химическим универсальным ингибитором TG 1,3-диметил-2-[(2-оксопропил)тио]имидазолия хлоридом, нанесенным при 400 мкМ.

Сравнение антитела АВ1 с другими известными ингибиторными антителами.

Для тестирования эффективности АВ1 в сравнении с другими известными ингибиторными антителами к TG2 как Fab фрагменты (фиг. 11, 12), так и полноразмерный IgG (фиг. 13, 14) антитела, как описано Quark Biotechnology в заявке на патент номер WO2006/100679, были протестированы на ингибирование активности TG2 в анализе включения <sup>3</sup>H путресцина. Активность 100 нг TG2 человека может быть ингибирована на 60-80% 500 нг АВ1. При сравнении ни Fab фрагмент, ни полноразмерный IgG антитела Quark не могли значимо ингибировать TG2 в данном анализе.

Обсуждение.

Существует явная необходимость в валидации TG2 в качестве терапевтической мишени у человека на протяжении ряда заболеваний, где экспериментальные исследования предположили ее вовлеченность. Эти заболевания включают рубцевание ткани, целиакию, нейродегенеративные заболевания и химиотерапевтическую резистентность при некоторых раках. Ограничением этого является недостаток соединений, специфичных к TG2, селективно ингибирующих активность TG2 у человека.

В данном исследовании авторы изобретения впервые иммунизировали мышей фрагментом TG2, чтобы иметь возможность выделить широкий ряд антител против TG2 против каталитического центрального участка этого фермента при поиске ингибиторных эпитопов. Это вызовет хороший иммунный ответ с антителами, распознающими как центральный участок rhTG2, так и нативную TG2, но не распознающими другие TG.

10 из выделенных антител показало ингибиторную активность. Затем для этих антител было картировано 3 TG2-специфичных, кроме того, ингибиторных эпитопа. Эти антитела клонированы, секвенированы, и выделены IgG с вычисленными значениями IC<sub>50</sub>. Доказано, что три антитела (АВ1, DC1 и ВВ7), нацеленные на связывающий карман субстрата, являются особенно эффективными ингибиторами. Наиболее важно, что эти антитела также хорошо действуют как на лизате клеток, так и в культуре клеток, что указывает на то, что эти антитела обладают потенциалом функционирования в окружающей среде, богатой белками, что является критическим для применения *in vivo*.

Авторы изобретения считают, что ключевым элементом в успешном создании этих ингибиторных антител, было решение иммунизировать только центральным белком. Согласно знаниям авторов изобретения ни одно из имеющихся в продаже антител против TG2 не обладают ингибиторным потенциалом какой-либо значимости. Собственные попытки авторов изобретения использовать полноразмерную TG2 привели в результате к большому числу антител, несколько из которых были специфичны к TG2, и ни одно из которых не было ингибиторным. По-видимому, это связано с явным иммуногенным предпочтением петель белка в пределах полноразмерной TG2, многие из которых попадают в заднюю часть каталитического центрального участка в положениях, аналогичных чаще всего используемым антителом против TG2, CUB7402 (aa447 aa478).

Неожиданно, что подход авторов изобретения привел к получению значительно более эффективных антител. Не связываясь какой-либо теорией, авторы изобретения считают, что простая индукция антител к белку меньшего размера, покрывающему только центральный участок, авторы изобретения не только устраняют некоторые из предпочитаемых иммунологических эпитопов, но также усиливают нацеливание на центральный участок. Одно это увеличивает разнообразие антител, доступных для отбора, и, следовательно, более широкого покрытия центрального участка. Тем не менее, иммунизация только центральным участком означает, что большая часть свертывания утрачивается, и, следовательно, некоторые из эпитопов, которые, возможно, были менее доступны в пределах полноразмерной молекулы TG2, могут представлять собой более привлекательные эпитопы, чем центральный участок, в данном формате. С учетом того, что все из 10 антител распознавали линейные эпитопы (то есть связывались с TG2 на восстанавливаемом геле), тогда как 80% антител, ранее выделенных авторами изобретения с использованием полноразмерной TG2 в качестве иммуногена, были конформационно зависимыми, позволяет предположить, что именно это может представлять собой основной фактор.

Ранее проведены другие исследования, в которых постулирована идея ингибиторного антитела к TG2 для применения в медицине. Esposito с соавторами разработали рекомбинантные антитела от пациентов с целиакией, где постулировано, что антитела к TG2 могут играть ингибиторную роль [19]. Одно из этих антител было разработано для коммерческого применения Quark Biotechnology, и подана заявка на патент (WO2006/100679). Данное антитело продемонстрировало некоторые вдохновляющие ранние данные при предупреждении фиброза почки в модели односторонней обструкции мочеточника (UUO; "Unilateral Ureteral Obstruction") на крысах. Тем не менее, авторы изобретения получили рекомбинантный вариант этого антитела, и, хотя оно реагировало с TG2 в анализе ELISA (фиг. 17) и Вестерн-блоттинге, авторы изобретения достигли небольшого ингибирования, составляющего 500 нг IgG на нг TG2 для данного антитела, при том, что все антитела, разработанные в данном исследовании, по существу полностью блокируют активность TG2. Кроме того, в WO2006/100679 раскрыто получение мышиного варианта данного антитела человека, и, как таковое, длительное применение в признанных моделях заболевания

почек на крысах оказывается затруднительным.

В описанном выше исследовании примечательно картирование 3 ингибиторных эпитопов в пределах центрального участка TG2. Эпитоп AB1 безусловно является наиболее эффективным в отношении мишени, что, возможно, неожиданно с учетом положения эпитопа. Исследование его положения в пределах предсказанной активной структуры TG2 [20] позволяет предположить, что он связывается на впускном канале каталитической триады, в котором может находиться карман субстрата. С учетом того, что в скрининговом анализе авторы изобретения использовали относительно мало субстратов (путресцин и диметилказеин), возможно, неожиданно, что данный сайт настолько эффективен. Тем не менее, положение эпитопа должно быть таким, чтобы IgG большого размера (150 кДа) плотно располагался в каталитическом сайте. На основании данных по эпитопам можно предсказать, что сайт DD9 может быть более эффективным, поскольку он связан с предполагаемым сайтом связывания кальция [21]. Тем не менее, исследование литературы позволяет предположить 5 или более предполагаемых сайтов связывания  $Ca^{2+}$  [21] и, хотя он обладает явным выраженным эффектом, он не является критическим для активности TG2 в целом.

Сайт DF4 гипотетически был бы наиболее эффективным эпитопом, поскольку антитело связывается с одной из незаменимых аминокислот в каталитической триаде. Тем не менее, невозможно было успешно клонировать DF4 при продуцировании данного ингибиторного антитела, и само продуцирование достаточного количества IgG для адекватного проведения тестов  $IC_{50}$  было невозможно. Действительно, может быть очень затруднительным клонировать антитела, обладающие слишком высокой эффективностью, с учетом работы Gunzler et al. (1982) FEBS Lett. 150(2): 390-6, в которой предположили, что лимфоциты, для пролиферации которых требуется активность TG2, и, следовательно, антитела, обладающие лучшим ингибиторным потенциалом, могут быть возможны только при использовании рекомбинантных подходов или континуальной системы экстракции IgG.

Одной из наиболее обескураживающих проблем при выполнении данной работы была явная неспособность всех разработанных антител к эффективному блокированию активности TG2, отличающейся от человека, что является критическим для доклинических испытаний. Все антитела реагировали с TG2 крысы и мыши как в Вестерн-блоттинге, так и в анализе ELISA, в некоторых случаях с небольшим различием по интенсивности. Тем не менее, из 9 антител авторы изобретения получили единственный IgG, для которого было возможно определить  $IC_{50}$  для 4 крыс и ни одной из мышей. Эти 4, где  $IC_{50}$  было вычислено против TG2 крысы, проявляли 30-кратную или более низкую кратность  $IC_{50}$  против TG2 крысы, чем AB1 против TG2 человека, что означает, что любая доза *in vivo* была бы неприемлемо велика. Кроме того, ни одно из них не будет ингибировать в лизате клеток крысы. С учетом реактивности в ELISA и Вестерн-блоттинге и, кроме того, что существует только 5 несовпадений между видами для AB1 и 3 для DD9, значительная видоспецифичность ингибирования была неожиданной и четко показывает принципиальную важность сродства для эффективного ингибирования. Таким образом, поскольку эти ингибиторные эпитопы идентифицированы для TG2 человека, теперь принципиально важно, что аналоговые антитела разработаны для этих сайтов в TG2 крысы, если их значение должно быть установлено в доклинических моделях заболевания *in vivo*.

Существует широкий ряд доступных ингибиторов TG. В частности, соединения на основе тиюимидазола, впервые разработанные Merke Sharpe Dome [22], аналоги карбобензокси (CBZ; от англ. "carb-benzoxy")-глутамила, разработанные Griffin с соавторами [23], которые авторы изобретения весьма успешно применяли для лечения экспериментального рубцевания почки [16], и ингибиторы дигидроизоказольного типа, разработанные Khosla с соавторами [24-27], успешно используемые в различных моделях рака. Была надежда, что в результате постоянного совершенствования этих соединений можно получить приемлемый ингибитор TG2 человека, но перекрестная реактивность семейства TG или потенциально токсическая природа этих соединений, по-видимому, предотвращает эту возможность. Более недавно раскрыты ацилиденоксоиндолы как новый обратимый класс ингибиторов TG2 [24], но данные, касающиеся их перекрестной реактивности к другим членам семейства TG, отсутствуют. На конференции Gordon 2010 по TG2 при заболеваниях человека Pasternack с соавторами из фирмы Zedira представили подробное описание ряда соединений, в которых используют акцепторы боковой цепи Майкла в качестве ингибиторов TG2, причем заявлена их пригодность для применения *in vivo* и селективность к TG2, тем не менее, полная публикация этих данных до сих пор не выполнена. На той же конференции в ранней работе авторов Macdonald et al. продемонстрированы некоторые интересные разработки в конструировании ингибитора TG2 для лечения хорей Гентингтона, но, опять же, полная публикация еще ожидается.

Несомненно, низкомолекулярный ингибитор TG2 был бы в высокой степени желателен, если бы его возможно было получить. Тканевая проницаемость, способность проходить гематоэнцефалический барьер, получение, стоимость и простота дозирования являются лишь несколькими из преимуществ. Тем не менее, в некоторых случаях ингибитор, представляющий собой антитело, разработанный в данном изобретении, может быть предпочтительным.

TG2 явно представляет собой многофункциональный фермент, связанный с рядом клеточных функций, включающих ядерную стабилизацию и транспорт [28, 29], эндоцитоз [30, 31], ГТФазную пере-

дачу сигнала [32-34], апоптоз [35, 36], клеточную адгезию [37-39], целостность цитоскелета [28, 29] и стабилизацию ВКМ [9]. Ясно, что низкомолекулярный ингибитор может затруднять все эти функции, поскольку, как правило, он имеет свободный доступ во внеклеточное пространство и внутрь клетки. Антитело не может проникать в клетку, и как таковое не может повлиять на внутриклеточные роли TG2. Важно, что в большинстве патологические роли TG2, по-видимому, являются внеклеточными, например ее роль при рубцевании ткани и фиброзе, целиакии и раке. Следовательно, применение антитела, селективно связывающего TG2, в медицине вносит дополнительную степень селективности, предотвращая нежелательные внутриклеточные эффекты. Таким образом, антитело обеспечило бы преимущества при блокировании TG2 при фибротических заболеваниях и заболеваниях, связанных с рубцеванием, где TG2 образует поперечные сшивки белков ВКМ, при целиакии, где глиадин претерпевает деамидирование во внеклеточном пространстве, и при резистентности к химиотерапии при раке, где клеточная адгезия, по-видимому, является защитным фактором. Тем не менее, за исключением случаев, когда может быть получен небольшой Fab фрагмент, который мог бы проходить через гематоэнцефалический барьер, антитело, ингибирующее TG2, мало применимо при лечении неврологических патологий.

В заключение, авторы изобретения впервые смогли разработать ингибиторные антитела к TG2, селективно нацеленные на TG2. Авторы изобретения также идентифицировали 3 новых ингибиторных эпитопа в пределах центрального домена TG2. Гуманизация антитела АВ1 впервые открывает возможность терапии, нацеленной на TG2, у человека.

#### Ссылки.

1. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. Verderio, E.A., T. Johnson, and M. Griffin, *Amino acids*, 2004. 26(4): p. 387-404.
2. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. Grenard, P., S. Bresson-Hadni, S. El Alaoui, M. Chevallier, D.A. Vuitton, and S. Ricard-Blum, *J Hepatol*, 2001. 35(3): p. 367-75.
3. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. Griffin, M., L.L. Smith, and J. Wynne, *Br J Exp Pathol*, 1979. 60(6): p. 653-61.
4. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation. Small, K., J.F. Feng, J. Lorenz, E.T. Donnelly, A. Yu, M.J. Im, G.W. Dorn, 2nd, and S.B. Liggett, *J Biol Chem*, 1999. 274(30): p. 21291-6.
5. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. Johnson, T.S., A.F. El-Koraie, N.J. Skill, N.M. Baddour, A.M. El Nahas, M. Njloma, A.G. Adam, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(8): p. 2052-62.
6. Thrombin upregulates tissue transglutaminase in endothelial cells: a potential role for tissue transglutaminase in stability of atherosclerotic plaque. Auld, G.C., H. Ritchie, L.A. Robbie, and N.A. Booth, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(10): p. 1689-94.
7. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. Mosher, D.F., *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 63-8.
8. Transglutaminases. Lorand, L. and S.M. Conrad, *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 9-35.
9. Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: a potential mechanism of tissue scarring. Fisher, M., R.A. Jones, L. Huang, J.L. Haylor, M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Matrix Biol*, 2009. 28(1): p. 20-31.
10. Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. Johnson, T.S., N.J. Skill, A.M. El Nahas, S.D. Oldroyd, G.L. Thomas, J.A. Douthwaite, J.L. Haylor, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(10): p. 2146-57.

11. Do changes in transglutaminase activity alter latent transforming growth factor beta activation in experimental diabetic nephropathy? Huang, L., J.L. Haylor, M. Fisher, Z. Hau, A.M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Nephrol Dial Transplant*, 2010. 25(12): p. 3897-910.
12. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. Suto, N., K. Ikura, and R. Sasaki, *J Biol Chem*, 1993. 268(10): p. 7469-73.
13. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. Kuncio, G.S., M. Tsyganskaya, J. Zhu, S.L. Liu, L. Nagy, V. Thomazy, P.J. Davies, and M.A. Zern, *Am J Physiol*, 1998. 274(2 Pt 1): p. G240-5.
14. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. Skill, N.J., T.S. Johnson, I.G. Coutts, R.E. Saint, M. Fisher, L. Huang, A.M. El Nahas, R.J. Collighan, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2004. 279(46): p. 47754-62.
15. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. Johnson, T.S., M. Fisher, J.L. Haylor, Z. Hau, N.J. Skill, R. Jones, R. Saint, I. Coutts, M.E. Vickers, A.M. El Nahas, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(12): p. 3078-88.
16. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. Huang, L., J.L. Haylor, Z. Hau, R.A. Jones, M.E. Vickers, B. Wagner, M. Griffin, R.E. Saint, I.G. Coutts, A.M. El Nahas, and T.S. Johnson, *Kidney Int*, 2009. 76(4): p. 383-94.
17. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. Shweke, N., N. Boulos, C. Jouanneau, S. Vandermeersch, G. Melino, J.C. Dussaule, C. Chatziantoniou, P. Ronco, and J.J. Boffa, *Am J Pathol*, 2008. 173(3): p. 631-42.
18. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Xu, L., S. Begum, J.D. Hearn, and R.O. Hynes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(24): p. 9023-8.
19. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. Esposito, C., F. Paparo, I. Caputo, M.

Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, T. Not, R. Porta, S. Auricchio, R. Marzari, and R. Troncone, *Gut*, 2002. 51(2): p. 177-81.

20. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. Pinkas, D.M., P. Strop, A.T. Brunger, and C. Khosla, *PLoS Biol*, 2007. 5(12): p. e327.

21. Functional significance of five noncanonical Ca<sup>2+</sup>-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. Kiraly, R., E. Csoz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I.R. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, and L. Fesus, *FEBS J*, 2009. 276(23): p. 7083-96.

22. 3,5 substituted 4,5-dihydroisoxazoles as transglutaminase inhibitors. Syntex, US Patent 4,912,120, 1990. March.

23. Griffin M, Coutts I G, and S. R, Novel Compounds and Methods of Using The Same., in International Publication Number WO 2004/113363, 2004: GB patent PCT/GB2004/002569.

24. Acylideneoxindoles: a new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. Klock, C., X. Jin, K. Choi, C. Khosla, P.B. Madrid, A. Spencer, B.C. Raimundo, P. Boardman, G. Lanza, and J.H. Griffin, *Bioorg Med Chem Lett*. 21(9): p. 2692-6.

25. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. Siegel, M. and C. Khosla, *Pharmacol Ther*, 2007. 115(2): p. 232-45.

26. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. Siegel, M., J. Xia, and C. Khosla, *Bioorg Med Chem*, 2007. 15(18): p. 6253-61.

27. Novel therapies for celiac disease. Sollid, L.M. and C. Khosla, *J Intern Med*. 269(6): p. 604-13.

28. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Fesus, L. and M. Piacentini, *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(10): p. 534-9.

29. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Lorand, L. and R.M. Graham, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(2): p. 140-56.

30. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. Toth, B., E. Garabuczi, Z. Sarang, G. Vereb, G. Vamosi, D. Aeschlimann, B. Blasko, B. Becsi, F. Erdodi, A. Lacy-Hulbert, A. Zhang, L.



Falasca, R.B. Birge, Z. Balajthy, G. Melino, L. Fesus, and Z. Szondy, *J Immunol*, 2009. 182(4): p. 2084-92.

31. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, and I.H. Pastan, *Nature*, 1980. 283(5743): p. 162-7.

32. GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket. Iismaa, S.E., M.J. Wu, N. Nanda, W.B. Church, and R.M. Graham, *J Biol Chem*, 2000. 275(24): p. 18259-65.

33. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP. Iismaa, S.E., L. Chung, M.J. Wu, D.C. Teller, V.C. Yee, and R.M. Graham, *Biochemistry*, 1997. 36(39): p. 11655-64.

34. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, K. Misono, M.J. Im, and R.M. Graham, *Science*, 1994. 264(5165): p. 1593-6.

35. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. Fesus, L. and V. Thomazy, *Adv Exp Med Biol*, 1988. 231: p. 119-34.

36. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. Fesus, L., V. Thomazy, and A. Falus, *FEBS Lett*, 1987. 224(1): p. 104-8.

37. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and beta1 integrin co-signaling. Telci, D., Z. Wang, X. Li, E.A. Verderio, M.J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2008. 283(30): p. 20937-47.

38. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, and M. Griffin, *Exp Cell Res*, 1998. 239(1): p. 119-38.

39. A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. Verderio, E.A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2003. 278(43): p. 42604-14.

## Пример 2. Секвенирование новых ингибиторных антител к TG2 по изобретению. Секвенирование антител.

С целью установления последовательностей переменных областей каждого антитела по изобретению осадок клеток гибридом обрабатывали с использованием набора Qiagen RNase Mini Kit для экстракции РНК, следуя протоколам изготовителя. Экстрагированную РНК подвергали обратной транскрипции для получения кДНК с использованием набора для синтеза первой нити ДНК 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare), используя праймер NotI-dT<sub>18</sub>, в соответствии с протоколами изготовителя. Препарат кДНК очищали, используя набор для очистки продуктов ПЦР Qiagen PCR Purification Kit, в соответствии с протоколами изготовителя.

Для определения последовательности тяжелой цепи кДНК мыши амплифицировали с помощью ПЦР, используя серию вырожденных праймеров (MHV1-12) с праймером константной области (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3 или смесью четырех праймеров), как показано в табл. 12. Аналогично, определения последовательности легкой цепи кДНК мыши амплифицировали с помощью ПЦР, используя серию вырожденных праймеров (MVK1-11) с праймером константной области МКС, как показано в табл. 13.

Если продукты амплификации не были видны при использовании первоначальной серии ПЦР тяжелой цепи, проводили 5' RACE PCR (Invitrogen), используя праймер NotI-dT<sub>18</sub>, для получения кДНК; и праймеры константной области (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3 или смесь всех четырех) и якорный праймер 5' RACE, GGCCACGCGTCTAGTACGGGIIIGGGIIIGGIIIG (где I представляет собой основание для дезоксиинозина) для ПЦР.

Полученные в результате полосы амплификации лигировали в векторе pCR2.1®-ТОРО®, используя набор для клонирования ТОРО-TA Cloning® (Invitrogen), используя протокол изготовителя, и посылали в фирму GATC Biotech AG для секвенирования.

Таблица 12

Праймеры ПЦР для клонирования переменных областей тяжелой цепи мыши

Название	Последовательность
Название	Последовательность
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATCTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRTTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTTCCCTT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCCTTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTATTATTG
MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2A	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

Коды неопределенности: R = A или G; Y = C или T; M = A или C; K = G или T; S = G или C; W = A или T.

MHV указывает на праймеры, гибридизующиеся с лидерными последовательностями генов переменной области тяжелой цепи мыши, MHCG указывает на праймеры, гибридизующиеся с геном константной области мыши.

Таблица 13

Праймеры ПЦР для клонирования переменных областей легкой цепи каппа мыши

Название	Размер	Последовательность
MKV1	30-мер	ATGAAGTTGVVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	29-мер	ATGGAGWCAGACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	30-мер	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGSGTTG
MKV4	33-мер	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	30-мер	ATGGATTTWAGGTGCAGATTTWCAGCTTC
MKV6	27-мер	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	31-мер	ATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	31-мер	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTCAATTG
MKV9	25-мер	ATGGTTRCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	27-мер	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
MKV11	28-мер	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCC
CL12A		ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT
CL12B		ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT
CL13		ATGGATTCACAGGCCAGGTCTTAT
CL14		ATGATGAGTCTGCCAGTTCCTGTT
CL15		ATGAATTTGCCTGTTCACTCTTGGTGCT
CL16		ATGGATTTTCAATTGGTCTCATCTCCTT
CL17A		ATGAGGTGCCTARCTCAGTTCCTGRG
CL17B		ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG
CL17C		ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG
MKC	20-мер	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

Коды неопределенности: R = A или G; Y = C или T; M = A или C; K = G или T; S = G или C; W = A

или T.

MKV указывает на праймеры, гибридизующиеся с лидерными последовательностями генов вариабельной области легкой цепи каппа мыши, MKC указывает на праймеры, гибридизующиеся с геном константной области каппа мыши.

Данные секвенирования.

Антитело AB1 было секвенировано в дополнение к антителам BB7, DC1, JE12, EH6, AG9, AH3, DD9, DH2, DD6 и IA12. Эти последовательности представлены на фиг. 18-28. Пример 3: Конструирование и характеристика химерных и гуманизированных новых антител против TG2 по изобретению.

Чтобы дополнительно охарактеризовать антитела по изобретению и обеспечить ранжирование и определение очередности антител для гуманизации, была сконструирована панель химерных антител к TG2 (вариабельные области мыши и IgG1 человека и каппа человека). Методология, использованная для получения химерного антитела, представлена ниже.

Методы.

Базы данных кДНК VH и VK.

Белковые последовательности иммуноглобулинов человека и мыши из Международной иммуногенетической базы данных 2009<sup>1</sup> и выпуск 5 базы данных Kabat Database Release 5 of Sequences of Proteins of Immunological Interest (последнее обновление 17 ноября 1999)<sup>2</sup> использовали для составления базы данных последовательностей иммуноглобулинов человека при выравнивании по Kabat. База данных авторов изобретения содержит 10606 последовательностей VH и 2910 последовательностей VK.

Молекулярная модель AB1.

В качестве репрезентативного примера антител группы 1 (то есть антител, связывающих эпитоп, перекрывающий аминокислоты 304-326 TG2 человека) вычислена модель гомологии мышинового антитела AB1, используя программу Modeler<sup>3</sup> в автоматическом режиме. Атомные координаты 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb и 1MQK.pdb представляли собой матрицы последовательностей самой высокой идентичности для Interface, VL и VH соответственно, как определено с помощью анализа Blast базы данных pdb структур антител Accelrys. Эти матрицы использовали для создания 20 первоначальных моделей, лучшие из которых уточняли путем моделирования каждой петли CDR с 3 наилучшими матрицами петель.

Выбор каркасного участка hAB1.

Программу анализа последовательностей gibsSR применили для детального исследования баз данных VH и VK человека с белковыми последовательностями VHc, VKc и VKc<sub>1</sub> AB1, VHc и VKc BB7 и VHc и VKc DC1, используя различные критерии отбора. Остатки FW в пределах 5Å от остатка CDR (определение Kabat) в модели гомологии мышинового антитела AB1 были идентифицированы и обозначены как остатки "приближенности 5Å".

Последовательность AF06220 была выбрана в качестве FW, на котором были основаны первоначальные гуманизированные варианты тяжелой цепи. В табл. 14 показано выравнивание и идентичность остатков AF06220 антителам мыши. В табл. 15 показаны границы приближенности 5Å последовательностей. Последовательность AF062260 имеет только одну соматическую мутацию по сравнению с ее геном VH зародышевой линии Z12347 (табл. 16).

Последовательность AY247656 была выбрана в качестве FW, на котором была основана первоначальная гуманизированная легкая цепь каппа AB1. Выравнивание и идентичность остатков с легкой цепью каппа антитела AB1 мыши показаны в табл. 17; в табл. 18 показаны границы приближенности 5Å последовательностей. Эта последовательность проявляет 5 соматических мутаций по сравнению с ее геном VK зародышевой линии X93620 (табл. 19).

Последовательность AF193851 была выбрана в качестве FW, на котором были основаны другие гуманизированные конструкции легкой цепи каппа. Выравнивание и идентичность остатков с антителами мыши показаны в табл. 20. В табл. 21 показаны границы приближенности 5Å последовательностей. Эта последовательность не проявляет соматических мутаций по сравнению с ее геном VK зародышевой линии J00248 (табл. 22).

Получение экспрессионных векторов.

Конструирование химерных экспрессионных векторов включает присоединение к VH и VL подходящей лидерной последовательности, которой предшествует сайт рестрикции Hind III и последовательность Козака. Последовательность Козака обеспечивает эффективную трансляцию последовательности вариабельной области. Она определяет корректный кодон AUG, от которого рибосома может начать трансляцию, и наиболее принципиально важным основанием является аденин в положении -3, выше старта AUG.

Для тяжелой цепи конструирование химерных экспрессионных векторов включает введение 5' фрагмента константной области  $\gamma 1$  человека, вплоть до естественного сайта рестрикции ApaI, примыкающего к 3' концу участка J вариабельной области. Область CH кодируется в экспрессионном векторе ниже встроенной последовательности VH, но в ней отсутствует интрон V-C.

Для легкой цепи естественный донорный сайт сплайсинга и сайт BamHI присоединяют ниже области V. Донорная последовательность сплайсинга способствует сплайсингу интрона V:C каппа, необходимому для присоединения VL к константной области в рамке считывания.

Последовательности ДНК переменных областей оптимизировали и синтезировали с помощью GeneArt®. Лидерная последовательность выбрана как последовательность, обеспечивающая высокую экспрессию антитела в культивируемых клетках млекопитающих.

Конструкции переменной области тяжелой цепи вырезали из клонирующего вектора, используя расщепление HindIII + ApaI, очищали и лигировали в аналогично расщепленном и обработанном фосфатазой экспрессионном векторе MRCT тяжелой цепи, и использовали для трансформации бактерий TOP10.

Конструкции переменной области легкой цепи каппа вырезали, используя расщепление HindIII + BamHI, очищали, лигировали в аналогично расщепленном и обработанном фосфатазой экспрессионном векторе MRCT легкой цепи каппа, и использовали для трансформации бактерий TOP10.

Экспрессия антитела.

Экспрессионный вектор с двойной вставкой, кодирующий как тяжелую, так и каппа-цепь, конструировали и трансфицировали им клетки HEK293T. Супернатант клеточной культуры очищали на агарозе с белком G в соответствии с протоколами изготовителя.

Анализ связывания ELISA.

Клетки HEK293F котрансфицировали комбинациями различных векторов гуманизированной легкой цепи в сочетании с различными векторами гуманизированной тяжелой цепи. Рекомбинантную TG2 человека использовали для измерения связывания антитела с помощью ELISA. Результаты показали, что вариант тяжелой цепи RHA (табл. 23) в комбинации с любым из вариантов легкой цепи RKE и RKJ (табл. 24) (представляющих собой различные варианты гуманизированной легкой цепи) проявили оптимальное связывание (фиг. 34) и были, следовательно, отобраны для дальнейшей характеристики. Аналогичный подход использовали для идентификации оптимальных пар тяжелой и легкой цепей гуманизированного BB7 и тяжелой и легкой цепей гуманизированного DC1.

Вариант RHA тяжелой цепи представляет собой немодифицированный продукт прививания участков CDR антитела AB1 мыши на донорную последовательность человека. Тем не менее, оба варианта легкой цепи RKE и RKJ имеют одну и ту же обратную мутацию остатка приближенности 5Å, F72 (табл. 24). Эта обратная мутация находится снаружи от остатков Vernier<sup>4</sup>, Canonical<sup>5</sup> или Interface<sup>6</sup>.

Ссылки.

1. Lefranc, M.P. IMGT, the international Immunogenetics database(R). *Nucleic Acids Res.* 31, 307-310 (2003).
2. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* NIH National Technical Information Service, (1991).
3. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* Chapter 5:Unit 5.6., Unit (2006).
4. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol. Biol.* 224, 487-499.
5. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modelling: implications for engineering and design. *Methods* 20, 267-279.
6. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol. Biol.* 186, 651-663.

В приведенной ниже табл. А суммированы полученные химерные и гуманизированные антитела с перекрестной ссылкой на идентификаторы, используемые в графических материалах.

Антитело мыши	Химерное антитело	Гуманизированное антитело
AB1	cAB001 cAB003	hAB004 (hAB001AE) hAB005 (hAB001AJ)
BB7	cBB001	hBB001AA hBB001BB
DC1	cDC001	hDC001AA hDC001BB
DD6	cDD6001	
DD9	cDD9001	
DH2	cDH001	

Таблица 14

Table with 8 columns (1-80) and rows for Kabat, Vernier, Canonical, Interface, Approximation 5A, CDR, AB\_VHc, BB7\_VHc, DC1\_VHc, and AF062260.

Таблица 15

Table with 2 columns: Name (AB\_VHc, BB7\_VHc, DC1\_VHc, AF062260) and Residues (e.g., EVQLCAFTLSWVRWVARFTISRNLCAKWG).

Таблица 16

Sequence alignment table showing positions 10-90 for sequences 212347.seq and AF062260.seq.

Таблица 17

Table with 8 columns (1-80) and rows for Kabat, Vernier, Canonical, Interface, Approximation 5A, CDR, AB\_VKc, and AY247656.

Таблица 18

Table with 2 columns: Name (AB\_VKc, AY247656) and Residues (e.g., EIVLTQTCWFITLIYGVFSGSGSQDFFIYCFG).

Таблица 19

Sequence alignment table showing positions 10-90 for sequences X93620.seq and AY247656.seq.

Таблица 20

Table with 8 columns (1-80) and rows for Kabat, Vernier, Canonical, Interface, Approximation 5A, CDR, AB\_Vk1, AB1\_Vk2, BB7\_VKc, DC1\_VKc, and AF193851.

Таблица 21

	<b>Остатки приближенности 5A</b>
AB_VKc1 (mAB002VK)	DIQMTQTCWFLLIYGVPFSGSGSQDFFYCFG
AB1_VKc2 (mAB003VK)	DIQKTQTCWFLLIYGVPFSGSGSQDFFYCFG
BB7_VKc (mBB001VK)	AIKMTQTCWFLLIYGVPFSGSGSQEFLYCFG
DC1_VKc (mDC001VK)	DITMTQTCWFLLIYGVPFSGSGSQDYAYCFG
AF193851	...M.....S.....T..T....

Таблица 22

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
J00248.seq	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTICRASQGISNYLAWFQ	QKPKAPKSLIYAASSLQ	SGVPSRFSGSGGTDFL	TISLQPEDFATYYCQYNS	YYP			
AF193851.seq	.....R.....	.....N.....	.....H.T..W	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Таблица 23

Номера по Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Vernier <sup>f</sup>	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
Canonical <sup>3</sup>	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
Interface <sup>6</sup>	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
Приближенность 5A	****	****	*	*	****	**	***	***	*****
CDR	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->
AB_RHA (hAB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAF	PKGLEWVSTISV--GGRTY	YFDSVKGRFTISRDN	SKNTLYL				
BB7_RHA (hBB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAF	PKGLEWVSTISS--GGR	STYFDSVKGRFTISR	DN	SKNTLYL			
BB7_RHB (hBB001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAF	PKGLEWVATISS--GGR	STYFDSVKGRFTISR	DN	SKNTLYL			
DC1_RHA (hDC001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSAMS--WVRQAF	PKGLEWVSTISS--GGR	STYFDSVKGRFTISR	DN	SKNTLYL			
DC1_RHB (hDC001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLSTHAMS--WVRQAF	PKGLEWVATISS--GGR	STYFDSVKGRFTISR	DN	SKNTLYL			

Таблица 24

Номера по Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Vernier <sup>f</sup>	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
Canonical <sup>3</sup>	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
Interface <sup>6</sup>	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
5A Proximity	*****	**	**	**	***	***	***	*****	*****
CDR	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->
AB_RKE (hAB001KE)	-EIVLTQSPSSLSASVGD	RVTTITCKASQ-----DINSY	LWFQKPKAPKLLIYR	TNRLFDGVP	SRFSGSGGTDF	FFLTISLQPE			
AB_RKJ (hAB001KJ)	-DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTITCKASQ-----DINSY	LWFQKPKAPKSLIY	RNRLFDGVP	SRFSGSGGTDF	FFLTISLQPE			
BB7_RKA (hBB001KA)	-DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTITCKASQ-----DINSY	LWFQKPKAPKSLIY	LNRLMDGVP	SRFSGSGGTDF	FFLTISLQPE			
BB7_RKB (hBB001KB)	-DIKMTQSPSSLSASVGD	RVTTITCKASQ-----DINSY	LWFQKPKAPKLIY	LNRLMDGVP	SRFSGSGGTDF	FFLTISLQPE			
DC1_RKA (hDC001KA)	-DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTITCKASQ-----DINSY	LWFQKPKAPKSLIY	LNRLVDP	SRFSGSGGTDF	FFLTISLQPE			
DC1_RKB (hDC001KB)	-DITMTQSPSSLSASVGD	RVTTITCKASQ-----DINSY	LWFQKPKAPKLLIY	LNRLVDP	SRFSGSGGTDF	FFLTISLQPE			

Таблица 24А

Тяжелая цепь - CDR1			
AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB	CAASGFTFSSAMSWVR CAASGFTFSSAMSWVR CAASGLIFSSAMSWVR CAASGFTFSTHAMSWVR CAASGFTLSTHAMSWVR	или FTSSAMSWVR или SSAMS. или FTSSAMSWVR или SSAMS. или IFSSAMSWVR или SSAMS. или FTSTHAMSWVR или THAMS. или FTLSTHAMSWVR или THAMS.	
Тяжелая цепь - CDR2			
AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB	WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTL WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR или TISVGGGKTYYPDSVKG. WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTL WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR или TISSGGRSTYYPDSVKG. WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTL WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSR или TISSGGRSTYYPDSVKG. WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTL WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR или TISSGGRSTYYPDSVKG. WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTL WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR или TISSGGRSTYYPDSVKG.	или WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN или TISVGGGKTYYPDSVKG. или WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN или WVSTISSGGRSTYYPDSVKG. или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTL или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTL. или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSR или TISSGGRSTYYPDSVKG. или WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN или WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN. или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTL или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN. или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR или TISSGGRSTYYPDSVKG. или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTL или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN. или WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR или TISSGGRSTYYPDSVKG.	
Тяжелая цепь - CDR3			
AB BB7 RHB	YCAKLISLYWG YCAKLISPYWG	или LISLY. или LISPY.	
BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB	YCAKLISPYWG YCAKLISLYWG FCARLISTYWG	или LISPY. или LISTY. или LISTY.	
Легкая цепь - CDR1			
AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB	TCKASQDINSYLTWY TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF	или KASQDINSYLT. или KASQDINSYLT. или KASQDINSYLT. или KASQDINSYLT. или KASQDINSYLT. или KASQDINSYLT.	
Легкая цепь - CDR2			
AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB	LLIYRTNRLFDGVFSRFGSGSGTDFD или LLIYRTNRLFDGVP SLIYRTNRLFDGVFSRFGSGSGTDFD или SLIYRTNRLFDGVP SLIYLTNRLMDGVFSRFGSGSGTDFD или SLIYLTNRLMDGVP TLIYLTNRLMDGVFSRFGSGSGQDFL или TLIYLTNRLMDGVP SLIYLVNRLVDGVFSRFGSGSGTDFD или SLIYLVNRLVDGVP ILIYLVNRLVDGVFSRFGSGSGQDYA или ILIYLVNRLVDGVP	или RTNRLFD или RTNRLFD или LTNRLMD или LTNRLMD или LVNRLVD или LVNRLVD	
Легкая цепь - CDR3			
AB RKE AB RKJ BB7 RKB	YCLQYDDFPYTFG YCLQYDDFPYTFG YCLQYDDFPYTFG	или LQYDDFPYT. или LQYDDFPYT. или LQYDDFPYT.	
BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB	YCLQYDDFPYTFG YCLQYDDFPYTFG YCLQYDDFPYTFG	или LQYDDFPYT. или LQYDDFPYT. или LQYDDFPYT.	

В табл. 14 показано выравнивание и идентичность последовательности AF062260 с мышиными антителами. Идентичность остатков показана точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо. Гэпы (-) используют для сохранения нумерации по Kabat, и чтобы показать инсерцию или делецию остатка, где применимо.

В табл. 15 показаны остатки каркасного участка тяжелой цепи антитела, расположенные в пределах границ 5Å участков CDR. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо.

В табл. 16 показано, что AF062260 имеет 1 соматическую мутацию по сравнению с геном VH зародышевой линии Z12347. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо.

В табл. 17 показано выравнивание и идентичность остатков AY247656 с мышинным антителом AB1. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо. Гэпы (-) используют для сохранения нумерации по Kabat, и чтобы показать инсерцию или делецию остатка, где применимо.

В табл. 18 показаны остатки каркасного участка легкой цепи каппа антитела AB1, расположенные в пределах границ 5Å участков CDR. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо.

В табл. 19 показано, что AY247656 имеет 5 соматических мутаций по сравнению с геном VK зародышевой линии X93620. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо.

В табл. 20 показано выравнивание и идентичность остатков AF193851 с мышиными антителами. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо.

Гэпы (-) используют для сохранения нумерации по Kabat, и чтобы показать инсерцию или делецию остатка, где применимо.

В табл. 21 показаны остатки каркасной области легкой цепи каппа антитела, расположенные внутри границ 5Å участков CDR. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо.

В табл. 22 показано, что AF193851 не имеет соматических мутаций по сравнению с геном VK зародышевой линии J00248. Идентичности остатков показаны точечными знаками (.). Различия остатков показаны, где применимо.

В табл. 23 показаны выравнивания последовательности конечных гуманизованных вариантов тяжелых цепей AB1, BB7 и DC1. Гэпы (-) используют для сохранения нумерации по Kabat, и чтобы показать инсерцию или делецию остатка, где применимо.

В табл. 24 показаны выравнивания последовательностей конечных гуманизованных вариантов легких цепей каппа AB1, BB7 и DC1. Гэпы (-) используют для сохранения нумерации по Kabat, и чтобы показать инсерцию или делецию остатка, где применимо.

В табл. 24а суммирована информация о последовательностях, представленных в табл. 23 и 24, в частности показаны последовательности CDR и CDR с фланкирующими участками в тяжелых и легких цепях антител AB, BB-7 и DC-1.

Характеризация химерных и гуманизованных антител.

Химерные и гуманизованные Ab анализировали на связывание с TG2 человека и яванского макака и на ферментативное ингибирование этих ферментов в соответствии с методологией, описанной ниже.

Методы.

Анализ ELISA на связывание TG2.

Связывание антитела с TG2 человека и яванского макака определяли в анализе ELISA. Прозрачные полистирольные 96-луночные планшеты "Maxisorp" (Nunc) покрывали 50 нг очищенной TG2 человека и яванского макака в 50 мкл 0,05 М карбонат-бикарбонатного буфера pH 9,6 при 4°C в течение ночи. Контрольные лунки покрывали 50 мкл 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA). Планшеты отмывали 3х 300 мкл фосфатно-солевого буферного раствора pH 7,4 (ФСБ), содержащего 0,1% Твин 20 (ФСБТ) и блокировали 300 мкл 3% мас./об. обезжиренного молока Marvel в ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. После 3х отмывки ФСБТ 50 мкл химерных или гуманизованных антител против TG2, очищенных на белке А, либо контроль изотипа антитела, представляющий собой IgG1 каппа человека, либо CUB7402 (Abscam) серийно разводили в 4 раза из высшей концентрации 50 нМ в ФСБ и добавляли в планшет в двух повторях. После 1 ч при комнатной температуре планшеты отмывали 3х в ФСБТ и инкубировали с 50 мкл IgG (Fc) коза против человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (Serotec), разведенным 1/5000 в 3% мас./об. обезжиренного молока Marvel в ФСБ, или для лунок, содержащих CUB7402, IgG (Fc) коза против мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена, 1/5000 (Sigma) в течение 1 ч при комнатной температуре. После 3х отмывки ФСБТ планшеты проявляли 50 мкл субстрата ТМБ (Sigma) в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего реакцию останавливали 25 мкл 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и считывали поглощение при 450 нМ в считывающем устройстве для микротитрационных планшетов (BioTek EL808). Анализировали кривые доза-ответ и определяли значения EC<sub>50</sub> и другие статистические параметры, используя 4-параметрическое логистическое соответствие данных (GraphPad Prism).

Анализ ингибирования TG2 антителами по изобретению на основе флуоресценции трансклутаминазы.

Трансклутаминазные активности очищенных ферментов TG2 человека (Zedira) или яванского макака (Trenzyme) измеряли путем включения дансильированного лизина KxD (Zedira) в N,N-диметилированный казеин (DMC, от англ. "N,N-dimethylated casein", Sigma). TG2 человека или яванского макака разводили в буфере переамидирования (25 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновая кислота (ГЭПЭС) pH 7,4, содержащий 250 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ ДТТ и 0,05% об./об. Плуороник F-127) до 1 и 10 нМ соответственно и смешивали с различными концентрациями мышиных, химерных или гуманизованных антител к TG2, очищенных на белке А, в течение 180 мин при комнатной температуре в 384-луночных черных микротитрационных планшетах (Corning). Реакции инициировали добавлением DMC и KxD до конечной концентрации 10 и 20 мкМ соответственно и конечного объема реакционной смеси 30 мкл и давали возможность протекания при КТ в течение 180 мин, и следили за возрастанием флуоресценции (относительные единицы флуоресценции, ОЕФ) (возбуждение при 280 нм, испускание при 550 нм), используя считывающее устройство для планшетов Tecan Safire<sup>2</sup>. Данные нормализовали на процент активности: % активности = (ОЕФ тестируемого антитела - ОЕФ низких контролей)/ОЕФ высоких контролей - ОЕФ низких контролей) × 100, где низкие контроли составляли все компоненты, за исключением фермента, а высокие контроли содержали все компоненты за исключением антитела.

Кривые доза-ответ антитела строили, используя программу GraphPad Prism, и находили соответствие, используя 4-параметрическую логистическую модель, для вычисления IC<sub>50</sub> и других статистических параметров. Результаты проиллюстрированы на фиг. 29-33.



Результаты и обсуждение экспериментов по ингибированию фермента и анализа связывания ELISA гуманизированными и мышинными антителами против TG2.

Способность химерных и гуманизированных антител к TG2 к ингибированию переамидирования TG2 человека определяли на основании дозозависимого ингибирования TG2-зависимого включения дансифированного лизина в N,N-диметилированный казеин (пример приведен на фиг. 29 и 31). Как химерные, так и гуманизированные антитела из группы 1 (например, сAB003, сBB001, CDC001, hBB001AA, hAB001BB, hAB005 и hAB004) проявляют эффективное ингибирование активности TG2 в низком наномолярном диапазоне, что согласуется с данными ELISA, показывающими связывание с иммобилизованной TG2 человека в том же диапазоне (фиг. 35 и 37). В противоположность этому, коммерческое антитело CUB7402 было неспособно ингибировать ферментативные активности TG2 человека и яванского макака (фиг. 29F и 30B), несмотря на сравнимое связывание с антителами группы 1 в анализах ELISA (фиг. 35A, 36A, 37A и 38A), что согласуется с распознаванием CUB7402 эпитопа, который не препятствует функции переамидирования фермента. Таким образом, антитела группы 1 можно отличить по их способности к ингибированию функции фермента от других антител, таких как CUB7402, которые связываются, но не действуют на ферментативную активность. Аналогично мышинные и химерные антитела, репрезентативные для группы 3 (например, mDD9001, mDH001, CDD9001 и CDH001) соответственно, ингибировали переамидирование TG2 человека, но с более низкой эффективностью, чем антитела группы 1 (фиг. 29 и 33). Ингибирование TG2 человека иллюстративными родительскими мышинными моноклональными антителами из группы 1 и группы 3 (фиг. 33) проявляют эффективности, сравнимые с их химерными и гуманизированными вариантами, что указывает на то, что функциональная эффективность мышинных антител сохраняется в гуманизированных вариантах. Аналогично данные связывания TG2 человека в ELISA для иллюстративных гуманизированных антител hBB001AA, hBB001BB и hAB004 (фиг. 37) показывают значения  $EC_{50}$ , сравнимые со значениями, полученными для химерных вариантов сBB001 и сAB003, что указывает на то, что связывающее средство также сохранено в гуманизированных вариантах. Химерные и гуманизированные антитела также проявляют эффективное ингибирование TG2 яванского макака (фиг. 30 и 32) и сравнимые значения  $EC_{50}$  в ELISA (фиг. 36 и 38) между видами, что согласуется с консервативностью родственного эпитопа в TG2 яванского макака, имеющего общую идентичность последовательности 99%. В противоположность этому, CUB7402 проявляет связывание с TG2 обоих видов, сравнимое с антителами группы 1, но не ингибирует ни одну из ферментативных активностей (фиг. 35-38 и 29-30).

Анализы на основе клеток.

Связывание антител по изобретению с внеклеточной TG2 из эпителиальных клеток НК-2 анализировали, используя описанный ниже протокол.

Измерение внеклеточной активности TG.

Внеклеточную активность TG измеряли с помощью модифицированного клеточного анализа ELISA. Эпителиальные клетки НК-2 собирали, используя аккутазу, и высевали при плотности  $2 \times 10^4$  клеток/лунка в среде без сыворотки на 96-луночный планшет, который был покрыт в течение ночи 100 мкг/лунка фибронектина (5 мкг/мл в 50 мМ Трис-НСl pH 7,4) (Sigma, Poole UK). Клеткам давали возможность прикрепиться в течение ночи при 37°C. Среду заменяли средой DMEM (Life Technologies) и добавляли соединения, антитела или контроли и давали возможность связываться при 37°C. В лунки добавляли 0,1 мМ биотин-кадаверин [N-(5-аминопентил-биотинамид)трифторуксусную кислоту] (Zedira), и планшет возвращали на 37°C в течение 2 ч. Планшеты дважды отмывали 3 мМ ЭДТА/ФСБ, и клетки удаляли 0,1% (мас./об.) дезоксихолатом в 5 мМ ЭДТА/ФСБ. Супернатант собирали и использовали для определения белка. Планшеты отмывали ФСБ/Твин, и включенный биотин-кадаверин выявляли, используя 1:5000 экстравидин-HRP (Sigma, Poole, UK) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем субстрат K Blue (SkyBio). Реакцию останавливали Red Stop (SkyBio), и поглощение считывали при 650 нм. Каждое антитело тестировали по меньшей мере в трех отдельных случаях.

Результаты представлены на фиг. 39 и 40 и показывают иллюстративную кривую и таблицу значений  $IC_{50}$ , полученных для тестируемых антител. На фиг. 39 показаны результаты для гуманизированного антитела AB1, а на фиг. 40 показаны результаты для гуманизированного антитела BB7.

hAB005 ингибировало внеклеточную TG2 клеток НК2 при  $IC_{50}$  71,85 нМ, и максимальное ингибирование составляло примерно 30% контрольной активности. hBB001AA ингибировало активность при  $IC_{50}$  19,8 нМ, и максимальное ингибирование составляло 40% контрольной активности. hBB001BB имело лучшую  $IC_{50}$ , равную 4,9 нМ, но максимальное ингибирование примерно 55% контроля.

Анализы методом зарастания царапины.

Анализы методом зарастания царапины также проводили для оценки связывающей активности гуманизированных и химерных антител против TG2 по изобретению.

Показано, что TG2 играет важную роль при фиброзе легких, и нокаут-мышцы по TG2 проявляют уменьшенное рубцевание и фиброз в модели блеомицина (Keith C. Olsen, Ramil E. Sapinoro, R.M. Kottmann, Ajit A. Kulkarni, Siiri E. Iismaa, Gail V.W. Johnson, Thomas H. Thatcher, Richard P. Phipps, and Patricia J. Sime (2011), Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis. Am. J of Respiratory & Critical Care

Med. 184 0699-707). Миграция клеток из нокаут-мышей по TG2 в царапину, нанесенную в клеточном монослое, была снижена по сравнению с диким типом. Анализ методом зарастания царапины проводили, чтобы оценить действие гуманизированных и/или химерных антител против TG2 по изобретению на скорость зарастания царапины в слое нормальных фибробластов легкого (клеток WI-38). Протокол анализа методом зарастания царапины:

Клетки WI-38 (нормальные фибробласты легких человека ATCC, № по каталогу CCL-75) высевали в 96-луночный планшет Image Lock (Essen, № по каталогу 4379) при плотности  $2 \times 10^4$ /луночка в среде DMEM (Life Technologies, № по каталогу 32561) с 10% ФБС и выращивали в течение ночи до более 97% конfluence. Клетки отмывали 2X средой DMEM без сыворотки, и царапину создавали, используя маркер Essen Wound Maker и протокол изготовителя. Среду удаляли и заменяли 95 мкл/луночка среды без сыворотки. В лунки добавляли контроли и тестируемые антитела. Планшет помещали в систему Essen IncuCyte, и зарастание царапины анализировали, используя протокол метода зарастания царапины.

Цитохалазин D использовали в качестве контроля анализа при 0,1 мкМ. R281, низкомолекулярный неспецифический ингибитор трансклотаминазы, тестировали при 100 мкМ. Пептид ZDON, представляющий собой необратимый ингибитор трансклотаминазы, тестировали при 10 мкМ и 100 мкМ. Имеющаяся в продаже антитело к TG2 Cub7402 (Abcam № по каталогу ab2386) тестировали при 5 мкг/мл. Антитела по изобретению тестировали по меньшей мере в трех случаях при различных концентрациях, как указано. Во всех экспериментах контроли, представляющие собой цитохалазин D при 0,1 мкМ и ZDON при двух концентрациях, проявляют дозозависимый эффект.

Иллюстративные результаты анализов методом зарастания царапины показаны на фиг. 41-44. Как видно на фиг. 41, все соединения: цитохалазин D, R281 и ZDON ингибировали зарастание царапины (было показано, что ZDON ингибирует его дозозависимо), но антитело Cub7402 не ингибировало зарастание царапины. Все антитела: гуманизированное антитело BB7, гуманизированное антитело AB1 и химерное антитело DC1 ингибировали зарастание царапины.

Значения сродства химерных и гуманизированных Ab против TG2.

Значения связывающего сродства (константы диссоциации  $K_d$  и скорости диссоциации) для панели химерных и гуманизированных Ab по изобретению против TG2 человека и TG2 яванского макака оценивали, используя методы Biacore. Протоколы и результаты описаны ниже и показаны на фиг. 45-47.

Методы Biacore.

Рекомбинантная TG2 человека была получена от фирмы Zedira GmbH (№ по каталогу T002). Рекомбинантная TG2 яванского макака была получена от фирмы Trenzyme. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR; от англ. "Surface plasmon resonance") измеряли на приборе Biacore T200 (GE Healthcare). Микрочипы CM5 (GE Healthcare № по каталогу BR-1006-68) покрывали моноклональным антителом IgG1 (Fc) мышь против человека (MAH; от англ. "mouse anti-human") (GE Healthcare № по каталогу BR-1008-39) путем аминного сочетания, как описано в инструкциях изготовителя. Буфер HBS-EP+ (0,01 M ГЭПЭС, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество P20) и буфер HBS-P+ (0,01 M ГЭПЭС, 0,15 M NaCl, 0,05 % поверхностно-активное вещество P20) приобретали у фирмы GE Healthcare в виде 10x концентрированных растворов (№№ по каталогу BR-1006-69 и BR-1006-71). Раствор хлорида кальция был получен от фирмы Sigma Aldrich (№ по каталогу 21115).

Способ, применяемый для определения сродства антител против TG2, включал иммобилизацию химерных или гуманизированных антител на чипе CM5, покрытом MAH, с последующим впрыскиванием серии образцов TG2 в подвижном буфере. Подвижный буфер представлял собой 1x HBS-P+, содержащий 1 mM  $CaCl_2$ , или 1x HBS-EP+ для экспериментов без кальция. Иммобилизацию антитела выполняли в течение времени контакта 120 с при скорости тока 10 мкл/мин, приводящего в результате к иммобилизации приблизительно 40-80 относительных единиц (ОЕ). TG2 впрыскивали на иммобилизованное антитело при концентрациях, находящихся в диапазоне от 25 до 400 нМ, при времени контакта вплоть до 600 с при скорости тока 30 мкл/мин. Диссоциацию TG2 в характерном случае измеряли в течение вплоть до 5400 с (1,5 ч). Затем выполняли регенерацию микрочипа, используя 3 M  $MgCl_2$  в течение времени контакта 60 с при скорости тока 30 мкл/мл с последующим периодом стабилизации 300 с перед следующим образцом. Для каждой из TG2, человека и яванского макака, проводили по меньшей мере 5 впрыскиваний при различных концентрациях по меньшей мере в двух отдельных экспериментах.

Кинетические данные экспортировали из программы Biacore T200 Evaluation Software и анализировали, используя программу GraphPad Prism, где фазы ассоциации и фазы диссоциации анализировали отдельно, используя однофазную модель ассоциации и однофазную модель экспоненциального затухания соответственно. Скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) вычисляли для каждой кривой отдельно, а значения скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) из данных, собранных для длительной фазы диссоциации. Где значения  $k_{off}$  были вычислены как составляющие менее  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , значения были установлены как  $1 \times 10^{-5}$  для анализов, поскольку более медленные скорости, чем данная скорость, не могут быть точно установлены. Значения для  $k_{on}$  и  $k_{off}$  представлены в таблицах ниже в виде среднего отдельных вычисленных значений для каждого антитела для TG2 каждого вида из множественных концентраций +/- 1 стандартное отклонение. Значения  $K_D$  вычисляют как среднее  $k_{off}$ /среднее  $k_{on}$ .

Таблица 25

## Результаты экспериментов Вiasoge

Антитело		TG2 человека				
		$k_{off}$ ( $c^{-1}$ )	Станд. откл.	$K_{on}$ ( $M^{-1}c^{-1}$ )	Станд. откл.	$K_D$ (M)
cAB003	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$< 6 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$8,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^{-10}$
cBB001	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$2,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$< 7 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$2,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-10}$
hAB005 (hAB001AJ)		$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$2,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$< 10^{-5}$	-	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$3,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
cDH001	+ $Ca^{2+}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$6,4 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$4,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^{-8}$
cDD9001	+ $Ca^{2+}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$7,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^{-9}$

В табл. 25 показаны кинетические данные, полученные против TG2 человека. Где скорости  $k_{off}$  были вычислены как составляющие менее  $10^{-5} c^{-1}$ , значения были установлены как  $10^{-5} c^{-1}$  для анализа, поскольку более медленные скорости, чем данная скорость, не могут быть точно установлены.

Таблица 26

Антитело		TG2 яванского макака				
		$k_{off}$ ( $c^{-1}$ )	Станд. откл.	$K_{on}$ ( $M^{-1}c^{-1}$ )	Станд. откл.	$K_D$ (M)
cAB003	+ $Ca^{2+}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$9,3 \times 10^{-11}$
cBB001	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$2,9 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
	- $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$1,8 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^{-11}$
hAB005 (hAB001AJ)		$3,4 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-10}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$3,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$< 3 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$3,7 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-10}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$4,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-11}$
cDH001	+ $Ca^{2+}$	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$	$< 7 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$6,3 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-9}$
cDD9001	+ $Ca^{2+}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{-10}$
	- $Ca^{2+}$	$4,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$8,9 \times 10^{-10}$

В табл. 26 показаны кинетические данные, полученные против TG2 яванского макака. Где скорости  $k_{off}$  были вычислены как составляющие менее  $10^{-5} c^{-1}$ , значения были установлены как  $10^{-5} c^{-1}$  для анализа, поскольку более медленные скорости, чем данная скорость, не могут быть точно установлены.

На фиг. 45-47 приведен пример серии данных Вiasoge. Как видно, гуманизированные и химерные антитела cAB003, cBB001, hAB004, hAB005, hBB001AA, hBB001BB, cDC001 к TG2 обладали отличным сродством к TG2 человека и яванского макака при значениях  $K_D$  120 пМ или лучше. Химерные антитела CDH001 и CDD9001 проявляют более медленные скорости ассоциации с TG2 человека и яванского макака и более слабое общее сродство. Исследование отбора антител в отсутствие кальция показало, что эффект является небольшим или отсутствует, за исключением случая CDH001 и CDD9001, где связывание является более слабым вследствие более высоких скоростей диссоциации ( $k_{off}$ ).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к транскляптаминазе типа 2 (TG2) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие следующие последовательности CDR:

KASQDINSYLT (LCDR1);

LVNRLVD (LCDR2);

LQYDDFPYT (LCDR3);

THAMS (HCDR1);

TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2) и

LISTY (HCDR3).

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность DITMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIVLNRLVDGVPSCR FSGSGSQDYALTISSLPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK, и переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLST HAMS WVRQAPGKLEWVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR LISTYWGQGLTIVTSS, или аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью с ними.

3. Антитело к TG2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие следующие последователь-

ности CDR:

KASQDINSYLT (LCDR1);  
 LTNRLMD (LCDR2);  
 LQYVDFPYT (LCDR3);  
 SSAMS (HCDR1);  
 TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2) и  
 LISPY (HCDR3).

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDGVPSR FSGSGSGQEFLLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK, и вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFSSS AMSWVRQAPGKLEWVATISSGGRSTYYPDSVKGGRFTVSRDSSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCAKL ISPYWGQGTLLTVSS, или аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью с ними.

5. Антитело к TG2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие следующие последовательности CDR:

KASQDINSYLT (LCDR1);  
 RTNRLFD (LCDR2);  
 LQYDDFPYT (LCDR3);  
 SSAMS (HCDR1);  
 TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2) и  
 LISLY (HCDR3).

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSR FSGSGSGTDFFTISSLQPEDFGTYYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK или DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFLLTISSLQPEDFATYYCLQ YDDFPYTFGQGTKVEIK, и вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKLEWVSTISVGGGKT YYPDSVKGGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTLLTVSS, или аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью с ними.

7. Антитело по любому из пп.1-6, где антитело представляет собой интактное антитело.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из следующих фрагментов: фрагмента Fv; Fab фрагмента и Fab-подобного фрагмента.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.8, который представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv или дисульфидно связанный фрагмент Fv.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.8, который представляет собой Fab' фрагмент или F(ab)<sub>2</sub> фрагмент.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, представляющее собой молекулу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

12. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2.

13. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.3, 4.

14. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.5, 6.

15. Фармацевтическая композиция для снижения или ингибирования ферментативной активности TG2, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11 в смеси с фармацевтически приемлемым эксципиентом или адьювантом.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, где композицию готовят для внутривенной, внутримышечной или подкожной доставки пациенту.

17. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 при получении лекарственного средства для снижения или ингибирования ферментативной активности TG2 у индивидуума, нуждающегося в этом.

18. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 при получении лекарственного средства для лечения целиакии, аномального заживления раны, рубцевания, гипертрофированных рубцов, глазного рубцевания, воспалительного кишечного заболевания, макулярной дегенерации, псориаза, заболеваний, связанных с фиброзом, атеросклероза, рестеноза, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, нейродегенеративных/неврологических заболеваний, глиобластомы, злокачественных меланом, протоковых аденокарцином поджелудочной железы, миелоидного

лейкоза, острого миелогенного лейкоза, миелодиспластического синдрома, миелопролиферативного синдрома, саркомы Капоши, болезни Гансена, коллагенозного колита.

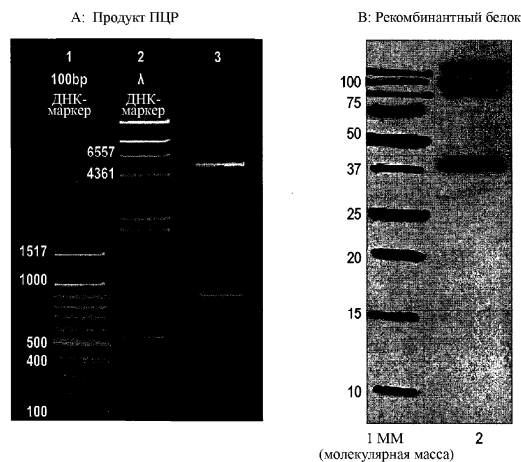
19. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 при получении лекарственного средства для диагностики целиакии, аномального заживления раны, рубцевания, гипертрофированных рубцов, глазного рубцевания, воспалительного кишечного заболевания, макулярной дегенерации, псориаза, заболеваний, связанных с фиброзом, атеросклероза, рестеноза, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, нейродегенеративных/неврологических заболеваний, глиобластомы, злокачественных меланом, протоковых аденокарцином поджелудочной железы, миелоидного лейкоза, острого миелогенного лейкоза, миелодиспластического синдрома, миелопролиферативного синдрома, саркомы Капоши, болезни Гансена, коллагенозного колита.

20. Применение по п.18 или 19, где заболевание, связанное с фиброзом, представляет собой фиброз печени, фиброз легких, интерстициальную болезнь легких, фибротическую болезнь легких, сердечный фиброз, миелофиброз, фиброз почек, гломерулосклероз и тубулоинтерстициальный фиброз.

21. Применение по п.18 или 19, где нейродегенеративное/неврологическое заболевание представляет собой болезнь Гентингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, полиглутаминовое заболевание, спинобульбарную мышечную атрофию, дентаторубро-паллидолюисовую атрофию, спиноцереbellлярную атаксию 1, 2, 3, 6, 7 и 12, рубропаллидарную атрофию или спиноцереbellлярный паралич.

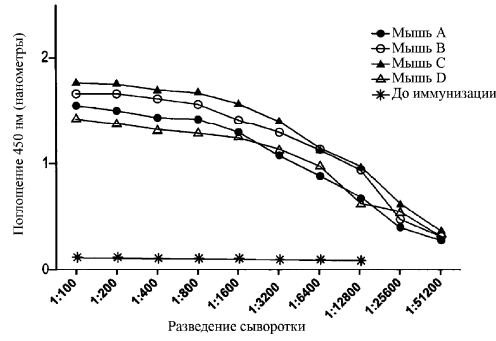
22. Способ *in vitro* снижения или ингибирования ферментативной активности TG2, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 в образец, содержащий TG2.

23. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11, включающий экспрессию полинуклеотида по любому из пп.12-14.

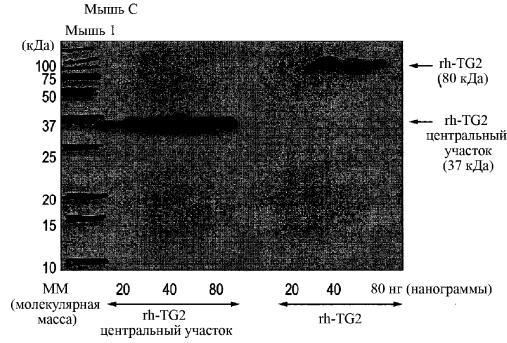


Фиг. 1

А: Анализ ELISA сыворотки

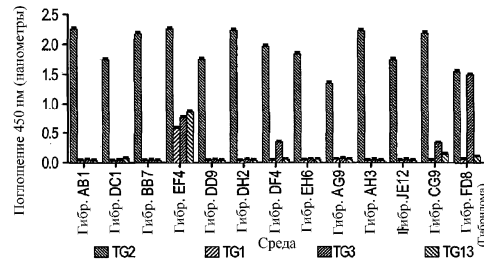


В: Вестерн-блоттинг сыворотки

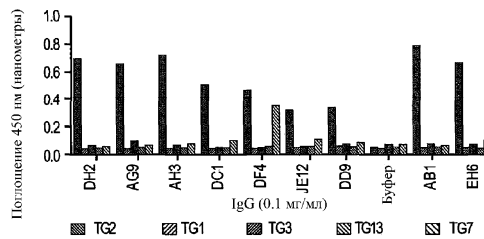


Фиг. 2

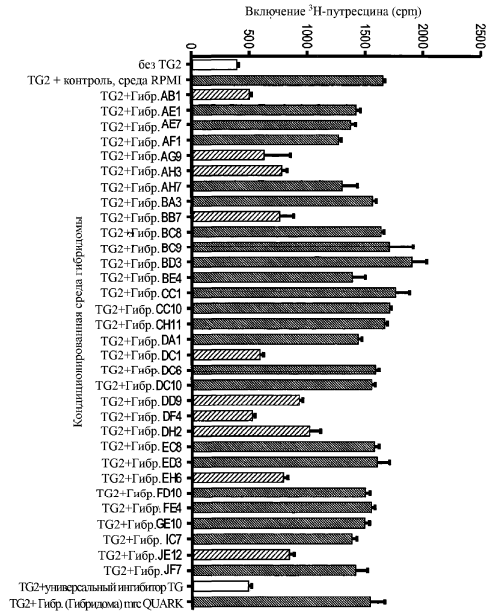
А: Первоначальный скрининг кондиционированной среды



В: Реактивность клонально очищенных mAb



Фиг. 3



Фиг. 4

Группа 1: Положение – перед активным центром – карман связывания субстрата

AB-1,	AG-1,	AH-1,	BB-7,	DC-1,	EH-6,	JE-12
Мышь TG2	YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELSNKSEMI					
Крыса	YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMI					
Человек	YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELSGDKSEMI					

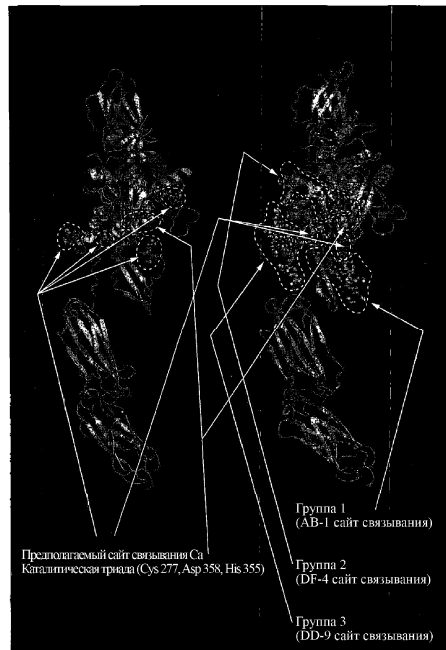
Группа 2: Положение – сзади от центрального участка за активным центром

DE-4	
Мышь TG2	SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPOEKSEGTGCCGPVS
Крыса	SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPOEKSEGTGCCGPVS
Человек	SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPOEKSEGTGCCGPVP

Группа 3: Положение – сзади от соединения центрального участка с доменом бета баррель 1

Включает сайт связывания кальция	
DD-9 и DH-2	
Мышь TG2	TYKYPEGSPEEREVFTKANHLNKLAEKKEETGVAMRIRVG
Крыса	TYKYPEGSPEEREVFTKANHLNKLAEKKEETGVAMRIRVG
Человек	TYKYPEGSSEEREAFTKANHLNKLAEKKEETGVAMRIRVG

Фиг. 5



Фиг. 6

Антитело AB-1

**AB1 VH**

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGCTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA  
 CTCCTCTGTGCAGCCTCTGGATCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGCTCTGGGTTCGC  
 CAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGTTCGCAACCATAGTGTGGTGGTAA  
 ACCCATATCCAGACAGTGTGAAGGTCGCTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG  
 AACCCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC  
 TGTGCAAATAATCAGTCTCTACTGGGCCAAGGCACACTCTCACAGTCTCCTCA

**AB1 VH**

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGK  
 THYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRSEDTAMYCAKLIISLYWGGTTLFVSS

**AB1 VK**

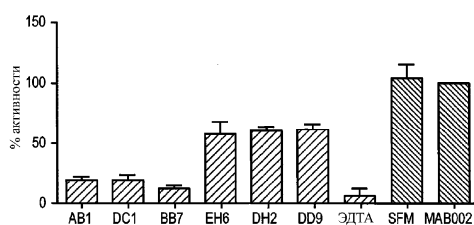
GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGATC  
 ACTATCACTTGCAGGGCAGTCAAGACATTAATAGCTATTAACTGGTTCAGCAG  
 AAACAGGGAATCTCCTAAGACCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTGATGGG  
 GTCCCATCCAGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTCCG  
 TACACGTTCGGAGGGGGACAAACTGGAATAAAA

**AB1 VK**

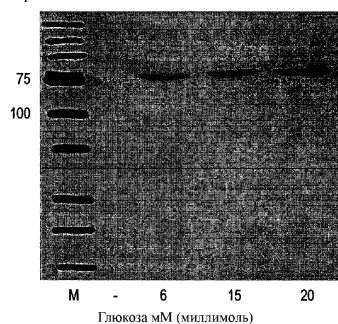
DIQMTQTPSSMYASLGERVITCKASQDINSYLTWFQKPKGSKPTLIYRITNRLFDG  
 VPSRFSGSGGQDFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

Фиг. 7

А: ингибирование TG



В: Вестерн-блоттинг

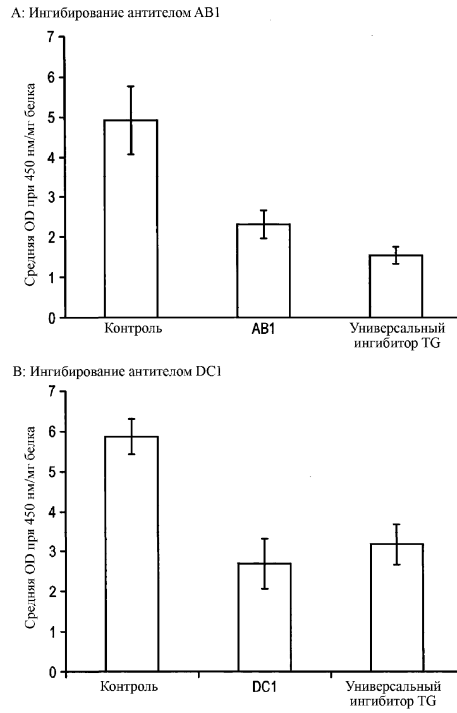


Фиг. 8

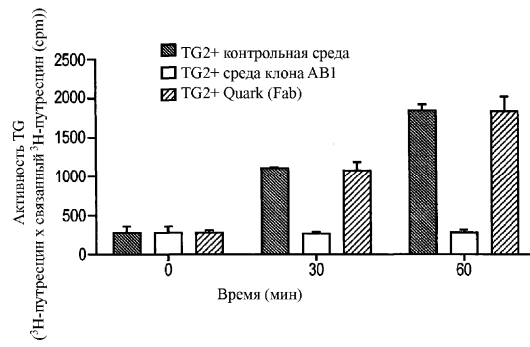
	IC50 hTG2 (мг/мл IgG на нг TG2)	IC50 rTG2 (мг/мл IgG на нг TG2)	IC50 mTG2 (мг/мл IgG на нг TG2)	Отношение человек/крыса	hTG2 IC50 Отношение для лучшего ингибитора человека	rTG2 IC50 Отношение для лучшего ингибитора человека
AB1	1.09x10 <sup>-5</sup>	НИ (не ингибирует)	НИ (не ингибирует)	-	1	-
DC1	1.23x10 <sup>-5</sup>	НИ (не ингибирует)	НИ (не ингибирует)	-	1.1	-
BB7	1.59x10 <sup>-5</sup>	3.2x10 <sup>-4</sup>	НИ (не ингибирует)	20	1.47	29.4
AG9	4.87x10 <sup>-5</sup>	НИ (не ингибирует)	НИ (не ингибирует)	-	4.47	-
DD9	5.24x10 <sup>-5</sup>	3.03x10 <sup>-4</sup>	НИ (не ингибирует)	6	4.87	29.22
DH2	6.7x10 <sup>-5</sup>	2.23x10 <sup>-4</sup>	НИ (не ингибирует)	-	6.2	38.13
EN6	6.9x10 <sup>-5</sup>	4.03x10 <sup>-4</sup>	НИ (не ингибирует)	5.8	6.33	36.714
AN3	7.8x10 <sup>-5</sup>	НИ (не ингибирует)	НИ (не ингибирует)	-	7.1	-
JE12	12.3x10 <sup>-6</sup>	НИ (не ингибирует)	НИ (не ингибирует)	-	11.3	-

Фиг. 9

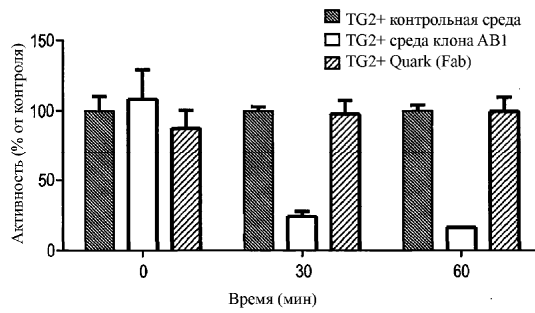




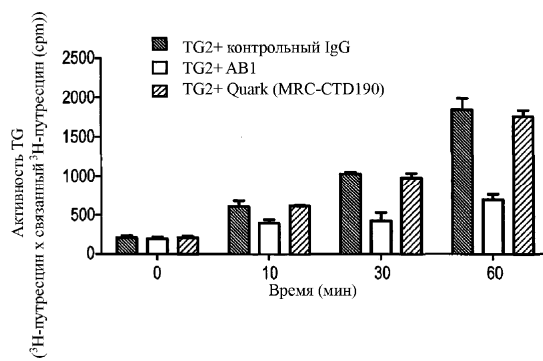
Фиг. 10



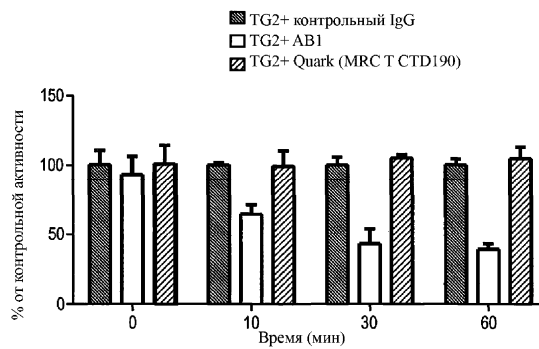
Фиг. 11



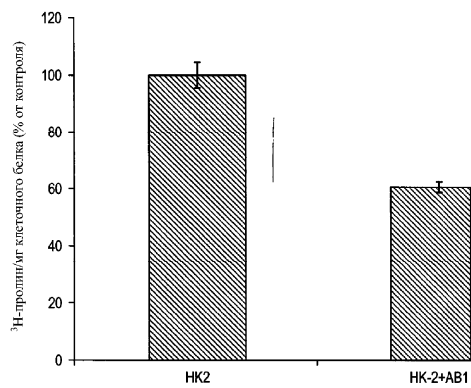
Фиг. 12



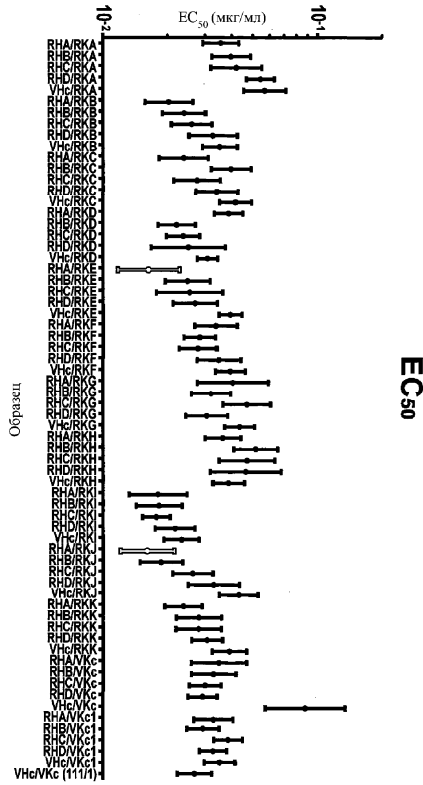
Фиг. 13



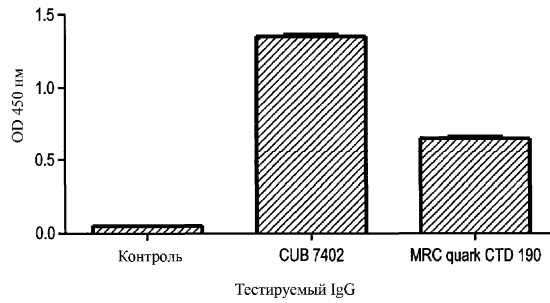
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

Антитело АВ-1

**AB1 VH**

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTGAAACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG  
ACAGGAGGCTGGAGTGGGTGGCAACCAATTAGTCTTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGAC  
AGTGTGAAGGGTCTCAACCATCCAGAGACAATGCCAAGAACCCCTCTATCTGCAAT  
GAACAGCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTCTGTGCAAACTAATCAGTCTCTACT  
GGGGCAAGGCACCACTCTCAGTCTCTCA

**AB1 VLH**

EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSRQTPDRRLIEWVATISVGGGKTYYPD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLWYQGDTTLTVSS

**AB1 VK**

GACATCAAGATGACCCAGTCCATCTCCATGTATGCATCTTAGGAGAGAGAGTCACTAT  
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTAACCTGGTCCAGCAGAAACCAGGGA  
AATCTCCTAAGACCTGATCTATCTGTAACAATAGATTGTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTT  
AGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTTTCTCACCATCAGCAGCTGGAATATGAAGATAT  
GGGAATTTATTTGTCACAGTATGATGACTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAAAC  
TGAAATAAAA

**AB1 VS**

DIKMTQSPSPSYASLGERVITCKASQDINSYLTWFQQKPKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRF  
SGSGSGQDFFLTISISLEYEDMGIYCLQYDDFYTFGGGKLEIK

Фиг. 18

Антитело BB-7

**BB7\_VH**

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGAAATCATTTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTGGGTCCGACAGACTCCGG  
AAGAAGACTGGAGTGGGTCCCAACTATTAGTAGTGGTGGTCCACCTACTATCCAGAC  
AGTGTGAAGGGTGGATTACCCGTCTCCAGAGACAGTCCCAAGAACCCCTATACCTGCARAT  
GGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTAAGTGTGCAAAAATATCAGTCCCTACT  
GGGGCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA

**BB7\_VK**

AVQLVESGGGLVLPKPGGSLKLSCAASGIIIFSSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD  
SVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS

**BB7\_VH**

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGATCATCAT  
CACTTGCAAGGCGAGTCAAGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTCCCAACAGAAACCAGGAA  
AGTCTCCTAAGACCTGATCTATCTTACAATAGATTGATGGATGGGTCCCATCAAGGTTC  
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTACTCACCATCAGCGGCTGGAAACATGAAGATAT  
GGGCATTTATTTATCTCCAGATGTTGACTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGC  
TGGAAATAAAA

**BB7\_VK**

AIKMTQSPSSMYASLGERVITCKASQDINSYLTWFQQKPKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRF  
SGSGSGQEFLLTIISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK

Фиг. 19

Антитело DC-1

**DC1\_VH**

GAAGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTGGGTCCGACAGACTCCGG  
AGAAGAGGCTGGAGTGGGTCCCAACCATTAAGTAGTGGTGGTCCACCTACTATCCAGAC  
AGTGTGAAGGGTGGATTCACTATCTCCAGAGACAAATGCAAGAACCCCTATATCTGCAACT  
GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTACT  
GGGGCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA

**DC1\_VH**

EVQLVESGGGLVLPKPGGSLKLSCAASGFLSLTHAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD  
SVKGRFTISRDNVNTLYLQLSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS

**DC1\_VK**

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTCCATAATGCATCTCTGGGAGAGAGTCACTAT  
CACTTGCAGGCGACTCAGGACATTAATAGCTATTAACTGGTCCAGCAGAAACCAGGAA  
AATCTCCTAAGATCTGATCTATCTTTAAATAGATTGGTAGATGGGTCCCATCAAGGTTC  
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATAT  
GGGAATTTATTTATCTACAATATGATGACTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGC  
TGGAAATAAAA

**DC1\_VK**

DIETMTQSPSSIIYASLGERVITCKASQDINSYLTWFQQKPKSPKILIVNRLVDGVPSRF  
SGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDFPYTFGGGTKLEIK

Фиг. 20

Антитело JE-12

**JE12\_VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCACTGAAAGTGTCT  
CTGCAGGCTCTGGATACAGATTCAGTACTAGTTATGCATCTGGGTGAAACAGAAAGTCTG  
GGCAGGGCTTGGTGGATTGGATATTTAATCCTTACAATGATGCTAAGTACAATGAG  
AAGTCAAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCAGCCTACATGGAGCT  
CAGCAGCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTACTATT  
GGGGCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA

**JE12\_VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVSRMSCKASGYRFTSYVMHWKQKSGGLEWIGYINPYNDGAKYNE  
KPKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

**JE12\_VK**

GATGTTTIGATGACCCAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCACTTGGAGATCAAGCCTCCAT  
CTCTTGCAAGTCTAGTCAAGCATTGAACATATTAATGGAACACCTATTAGAAATGGTACC  
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCAAAAGTTCCAAACCGATTTCTGGG  
GTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGT  
GGAGGCTGAAGATCTGGAAATTTACTGCTTCAAGGTTCAATGTTCCGTTCAAGTTCG  
GAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA

**JE12\_VK**

DVLMNTQNPFLSLPVSLGDAQISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLPKPGQSPKFLIYKVSNRFSG  
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSVHFFTFGGGTKLEIK

Фиг. 21

Антитело EH-6

**EH6\_VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
CTGCAGGGCTTCGGATACACATTCACATAGTTATGTTATGCAGCTGGGTGAAGCAGAAGCCTG  
GGCAGGGCCTTCAGTGGATTGGATTATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAG  
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCTCAGACAAAGCCTCCACCACAGCTACATGGAGCT  
CAGCAGCTGACCTCTGAGGACTCTGGGCTTATTACTGTGCAAGATTCTCCTCTGGTACT  
GGGGCCAAAGGCCACTCTCACAGTCTCCTCA

**EH6\_VK**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWKPKQGQLEWIGFINPYNDGTYNE  
KFKGKATLTSKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSGYWGQTTLTVSS

**EH6\_VK**

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTGGAGATCAAGCCTCCAT  
CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC  
TGCAGAAACAGGCCAGCTCTCCAAAGTCTGATCTACAAGTTTCCAATCGATTTCTGGG  
GTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCAGAGT  
GGGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTACTGCTTCAAGTTTCAACATGTTCCCTTACAGTTCG  
GCTCGGGACAAAGTGGAAATAAAA

**EH6\_VK**

DVLMITQPLSLPVSIGDQASISCRSSQSIHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVNRFSG  
VPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVAEDLGVYYCLQVSHVPTFGSGTKLEIK

Фиг. 22

Антитело AG-9

**AG9\_VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
CTGCAGGGCTTCGGATACACATTCACATAGTTATGTTATGCAGCTGGGTGAAGCAGAAGCCTG  
GGCAGGGCCTTCAGTGGATTGGATTATTAATCCTTACAATGATGGTCTAGTACAAATGAG  
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCTACATGGAACI  
CAGCAGCTGACCTCTGAGGACTCTGGGCTTATTACTGTGCAAGATTCTTAGTACTACT  
GGGGCCAAAGGCCACTCTCACAGTCTCCTCA

**AG9\_VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWKPKQGQLEWIGYINPYNDGARYNE  
KFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQTTLTVSS

**AG9\_VK**

GATGTTTTGATGACCCAAATCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTGGGATCAGGCCCTCCAT  
CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC  
TGCAGAAACAGGCCAGCTCTCCAAAGTCTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTTCTGGG  
GTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAGGATCAGCAGTGT  
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTACTGCTTCAAGTTTCAACATGTTCCGTTACAGTTCG  
GAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

**AG9\_VK**

DVLMITQPLSLPVSIGDQASISCRSSRSIEHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVNRFSG  
VPDRFSGSGSGTDFTLRISVVAEDLGVYYCFQGSHPFTFGGKLEIK

Фиг. 23

Антитело AH-3

**AH3\_VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC  
CTGCAGGGCTTCGGATACACATTCACATAGTTATGTTATGCAGCTGGGTGAAGCAGAAGCCTG  
GGCAGGGCCTTCAGTGGATTGGATTATTAATCCTTACAATGATGGTCTAGTACAAATGAG  
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCTACATGGAACI  
CAGCAGCTGACCTCTGAGGACTCTGGGCTTATTACTGTGCAAGATTCTTAGTACTACT  
GGGGCCAAAGGCCACTCTCACAGTCTCCTCA

**AH3\_VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWKPKQGQLEWIGYINPYNDGARYNE  
KFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQTTLTVSS

**AH3\_VK**

GATGTTTTGATGACCCAAATCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTGGAGATCAGGCCCTCCAT  
CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC  
TGCAGAAACAGGCCAGCTCTCCAAAGTCTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTTCTGGG  
GTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAGGATCAGCAGTGT  
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTACTGCTTCAAGTTTCAACATGTTCCGTTACAGTTCG  
GAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

**AH3\_VK**

DVLMITQPLSLPVSIGDQASISCRSSRSIEHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVNRFSG  
VPDRFSGSGSGTDFTLRISVVAEDLGVYYCFQGSHPFTFGGKLEIK

Фиг. 24

Антитело DD-9

**DD9\_VH**

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGAC  
TTGTTCTTTTCTGGGTTTCACTGAGCACTTCGGGTATGGGTGAGTTGGAITCGTCAGT  
CCTCAGGAAAGGCTCGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAGCGCTATAAC  
CCATCCCTGAAGGCCGGATCACAACTCCCAAGGATTCCTCAAGCAACCAGGTAATCTCTCAA  
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTAATGTCTGCTGAGTGGACTACGG  
CCCCGTTGCTTCTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**DD9\_VK**

QVTLKESGPILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKLEWLAHIYWDKRYN  
PSLKSRLTISKDSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTPAFYWGQGLVTVSA

**DD9\_VK**

CAAAATGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACAT  
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAGATTACATGTACTGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT  
CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACTGGTCTCGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCAAAATCAGCCGAATGGGGCTGAAGATGCTGC  
CACTTATTAATGCAACAGTGGAAATAGTCCCGCTCAGTTCGGTCTGGGACCAAGCTGG  
AGCTGAAA

**DD9\_VK**

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVDYMYWYQKPGSSPRLLIYDTSNLSAGVPPVRF  
GSGSGTSYSLTISRMEADAATFYCQWSSPLTFGAGTKLELK

Фиг. 25

Антитело DH-2

**DH2\_VH**

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGAC  
TTGTTCTTTTCTGGGTTTCACTGAGCACTTCGGTATGGGTGAGTTGGAITCGTCAGC  
CTTCAGGAAAGGCTCGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAGCGCTATAAC  
CCATCCCTGAAGGCCGGCTCACAACTCCCAAGGATACCTCCAGCAACCAGGTAATCTCTCAA  
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTCTGCTGAGTGGACTACGG  
CCCCGTTGCTTACTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**DH2\_VH**

QVTLKESGPILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKLEWLAHIYWDKRYN  
PSLKSRLTISKDSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTPAFYWGQGLVTVSA

**DH2\_VK**

CAAAATGTTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACAT  
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAGATTACATGTACTGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT  
CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACTGGTCTCGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCAAAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGC  
CACTTTTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTCCCGCTCAGTTCGGTCTGGGACCAAGCTGG  
AGCTGAAA

**DH2\_VK**

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVSYMYWYQKPGSSPRLLIYDTSNLSAGVPPVRF  
GSGSGTSYSLTISRMEADAATFYCQWSSPLTFGAGTKLELK

Фиг. 26

Антитело DD-6

**DD6\_VH**

GAGGTCAGCTGCAACAGTCTGGCCCTGAACTGGTGAAGCCCTGGGCTCAGTGAAGATGTC  
CTGCAAGGCTCTGGATACAGATTCACTGACTCAACATGCACTGGTGAAGCAGAACCTTG  
GAAAGAGCCTTGAGTGCATTCGATATATTAACCTAAAAATGCTGTATTACTACAACAG  
AAGTTCAAGGGCAAGGCCAATTGACAGTGAACAGGTCTCCAAACAGCCTACATGGAGAT  
CCGCAGCCTGACATCGGAAGATTCTGCAGTATTAATGCTGCAACAGCTCTGACTTACTGG  
GACAAGGGACTCTGCTCACTGTCTCTGCA

**DD6\_VH**

EVQLQQSGPELVPKPGASVKMSCKASYRFTDYNMHWKQNLGKSLIEWIGYINPKNGVIYYNQ  
KFKGKATLVNRRSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYWGQGLVTVSA

**DD6\_VL**

CAGGCTGTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCAGATCACCTGGTGAACAGTCACTCAC  
TTCTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTCAGCTAATACTATGCCAATGGATCCAGAAAAC  
CAGATCAITTTATCACTGGTCTGATAGCTGGTACCAACAGCCAGCTCCAGGTGTCTCTGCC  
AGATTCTCAGGTCCTGATAGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGA  
GGATGAGCAATATTTCTGTGCTATGGTACAGCAACTATTGGGTGTCGGTGGAGGAA  
CCAAAGTGACTGTCCTAGGC

**DD6\_VL**

QAVVTEESALTTSPGETVTLTCSRSTGVAANNYANWIQEKPDHLFTGLIAGTKRPAQVPA  
RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGKTKTVLGL

Фиг. 27

Антитело IA-12

**IA12\_VH**

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC  
 CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTTATGGAATGACCTGGGTGAAACAGGCTCCAG  
 GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTCTCTGGAGTCCCAACATATGCTGAT  
 GACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT  
 CAACAACCTCAAAGTGAAGACGGCTACATATTTCTGTGCAAGACCGGAAGTTGCTTACT  
 GGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**IA12\_VL**

QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWINTSSGVPTYAD  
 DFKRFAFSLSTSASTAYLQINNLKSEDTATYFCARPEVAYWQGITLVTVSA

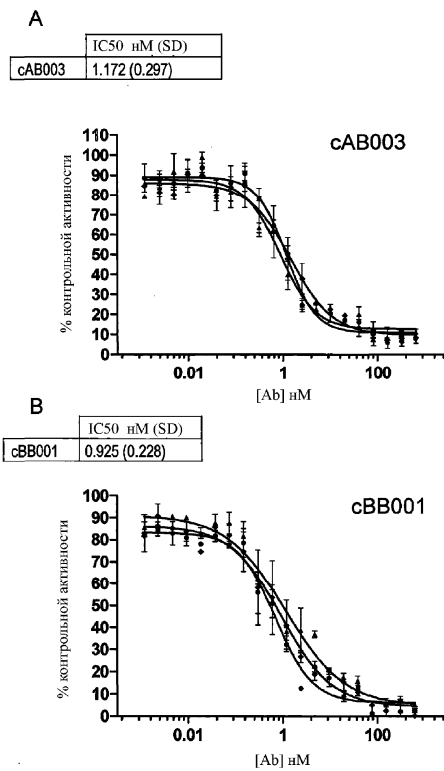
**IA12\_VK**

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCCGTTACCTTTGGACAACAGCCTCTAT  
 CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATGATAATGGAAGACTTATTTGCATTGGTTAT  
 TTCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGGCGCTAATCTATCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGA  
 GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACTGAAAATCAGCAGAT  
 GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGAAGGTACACATTTCCGTACACGTTTCG  
 GAGGGGGACCAAACTGGAAATAAA

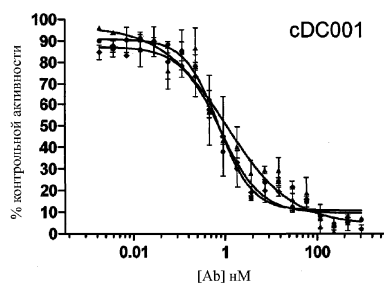
**IA12\_VK**

DVVMTQTPLTLVFTGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFRFGQSPRLIYLVSKLDSG  
 VPRFTGSGSGDFTLTKISRVEAEDLGVYCVQGFHPYTFGGGKLEIK

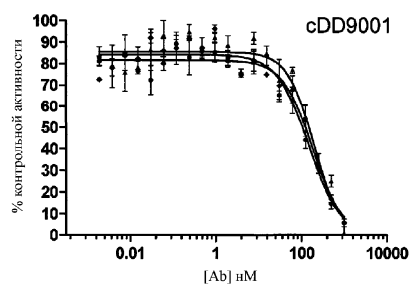
Фиг. 28



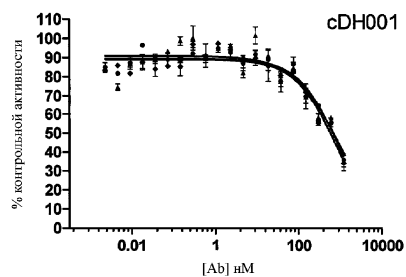
	IC50 нМ (SD)
cDC001	0.851 (0.177)



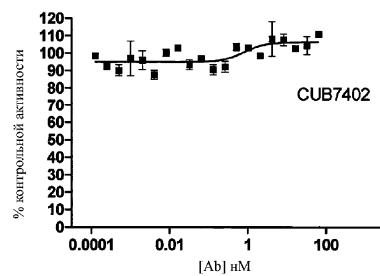
	IC50 нМ (SD)
cDD9001	172.033 (23.353)



	IC50 нМ (SD)
cDH001	829.233 (59.923)



	IC50 нМ
CUB7402	>100

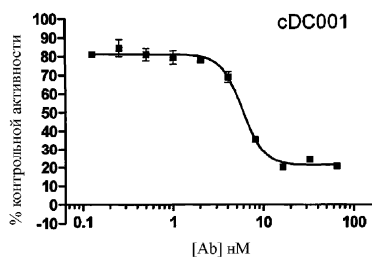


Фиг. 29



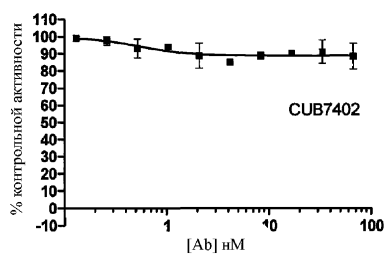
A

	IC50 нМ
cDC001	5.862



B

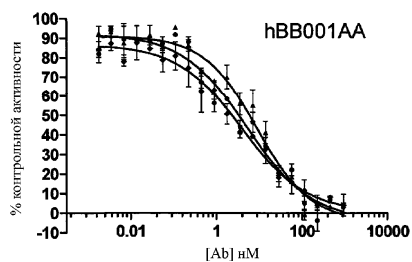
	IC50 нМ
CUB7402	>100



Фиг. 30

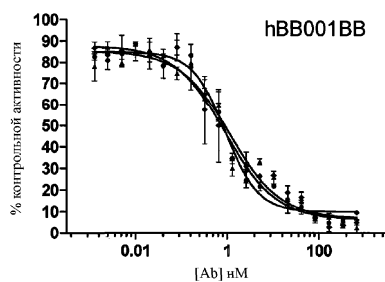
A

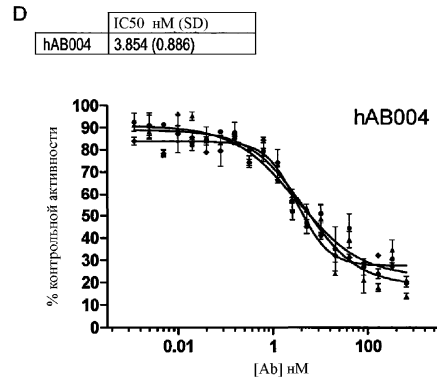
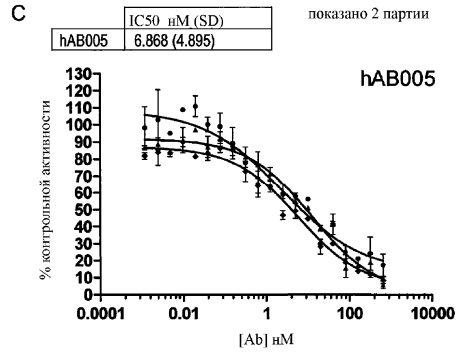
	IC50 нМ (SD)
hBB001AA	5.987 (2.643)



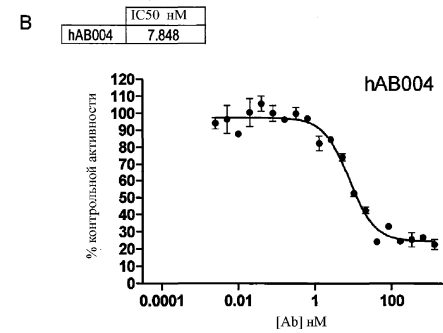
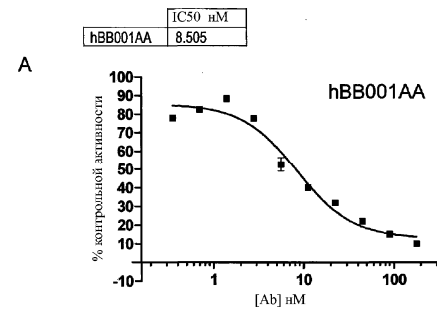
B

	IC50 нМ (SD)
hBB001BB	0.985 (0.140)

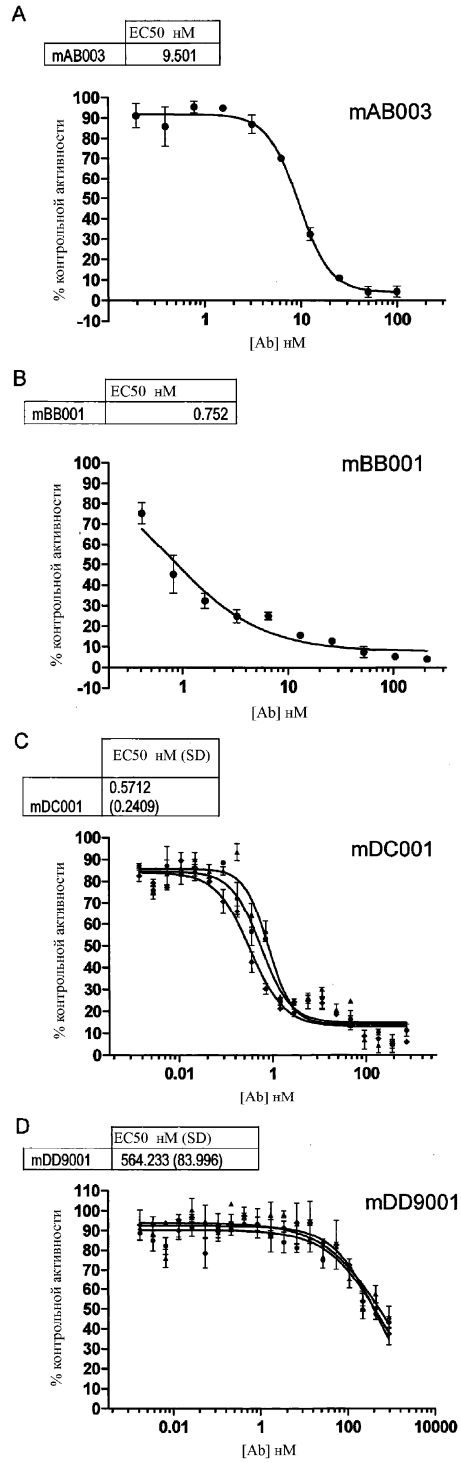




Фиг. 31

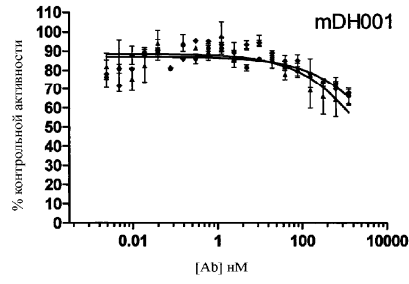


Фиг. 32



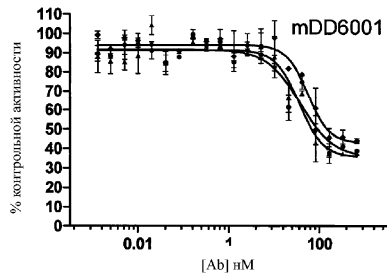
E

	EC50 нМ (SD)
mDH001	~7000

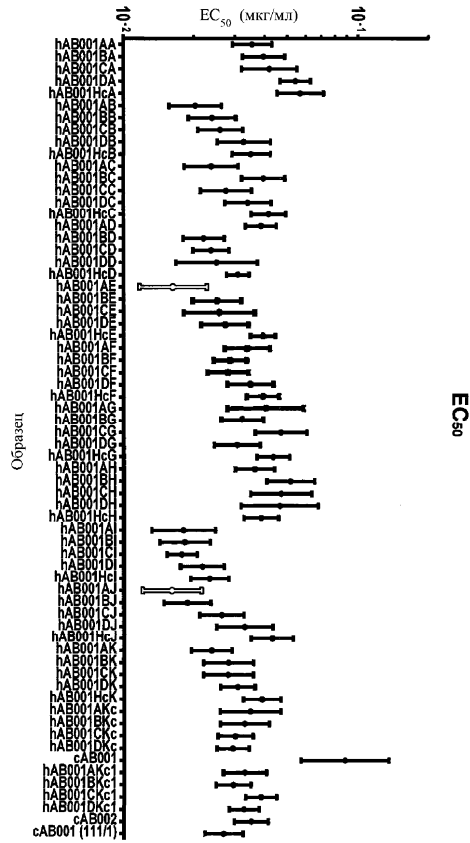


F

	EC50 нМ (SD)
mDD6001	43.196 (10.948)



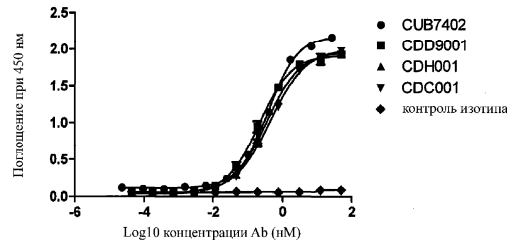
Фиг. 33



Фиг. 34

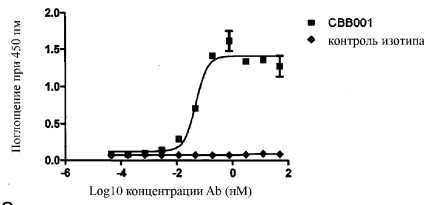
**A**

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (нМ)	0.3804	0.2099	0.3401	0.4418
r2	0.9991	0.998	0.9988	0.9985
EC50 (95% доверительный интервал)	0.3291 to 0.4396	0.1860 to 0.2368	0.2890 to 0.4002	0.3927 to 0.4971



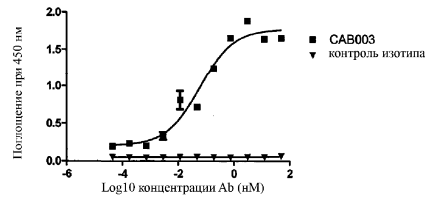
**B**

	CBV001
EC50 (нМ)	0.04811
r2	0.9682
EC50 (95% доверительный интервал)	0.03611 to 0.06410



**C**

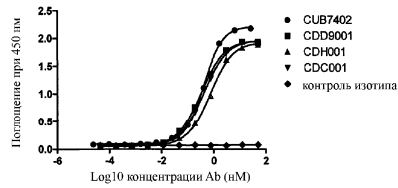
	CAV003
EC50 (нМ)	0.06141
r2	0.9568
EC50 (95% доверительный интервал)	0.03066 to 0.1230



Фиг. 35

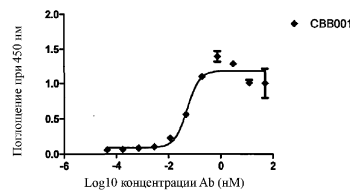
**A**

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (нМ)	0.4161	0.3279	0.7385	0.4177
r2	0.9994	0.9992	0.9986	0.9993
EC50 (95% доверительный интервал)	0.3762 to 0.4603	0.3040 to 0.3536	0.6882 to 0.8162	0.3887 to 0.4489



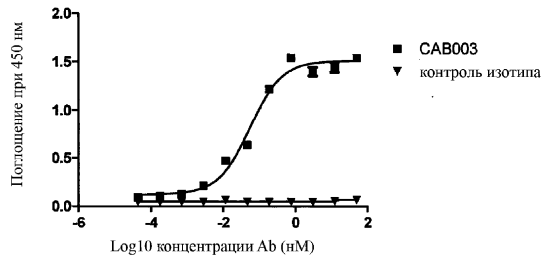
**B**

	CBV001
EC50 (нМ)	0.05166
r2	0.9383
EC50 (95% доверительный интервал)	0.03303 to 0.08079



C

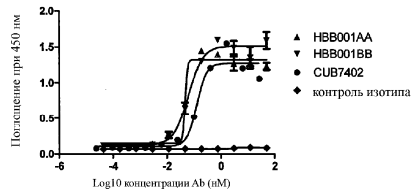
	CAB003
EC50 (нМ)	0.05682
r2	0.9837
EC50 (95% доверительный интервал)	0.04054 to 0.07966



Фиг. 36

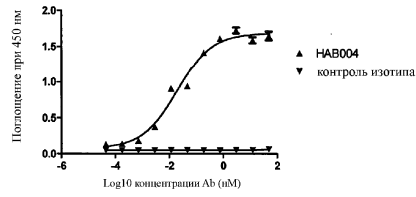
A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (нМ)	0.1277	~ 0.04739	0.06274
r2	0.9588	0.9792	0.9771
EC50 (95% доверительный интервал)	0.06801 to 0.2396	ND	0.04636 to 0.08491



B

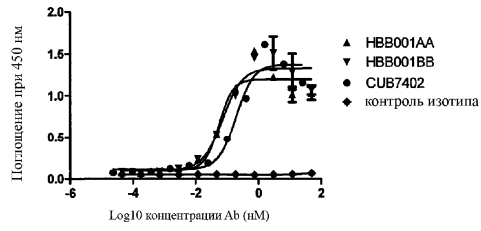
	HAВ004
EC50 (нМ)	0.02001
r2	0.9794
EC50 (95% доверительный интервал)	0.01199 to 0.03342



Фиг. 37

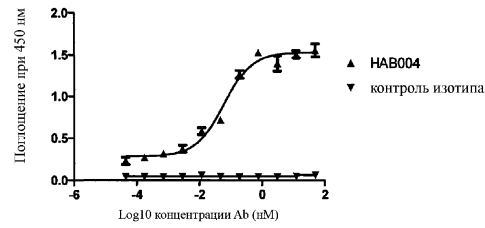
A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (нМ)	0.1982	0.0561	0.07377
r2	0.9586	0.9329	0.9361
EC50 (95% доверительный интервал)	0.09303 to 0.4223	0.03522 to 0.08934	0.04198 to 0.1296



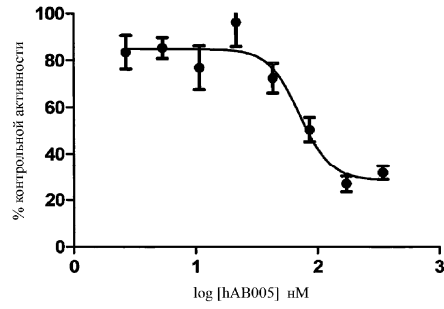
B

	HAB004
EC50 (нМ)	0.06117
r2	0.9766
EC50 (95% доверительный интервал)	0.04047 to 0.09246



Фиг. 38

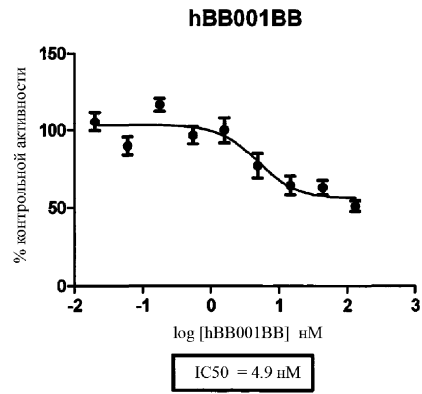
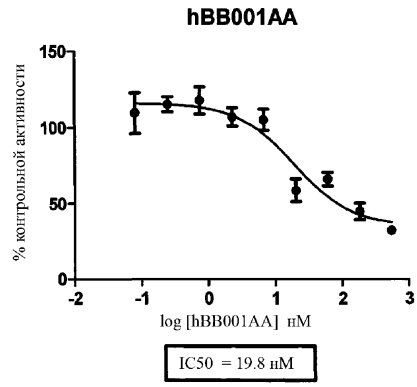
**hAB005**



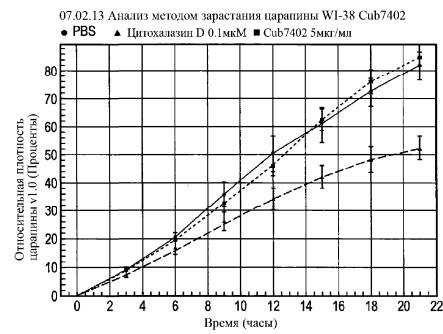
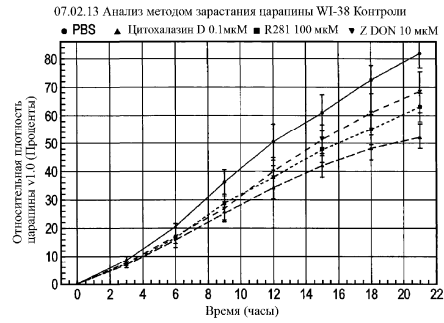
IC50 = 71.85 нМ

Фиг. 39

036810

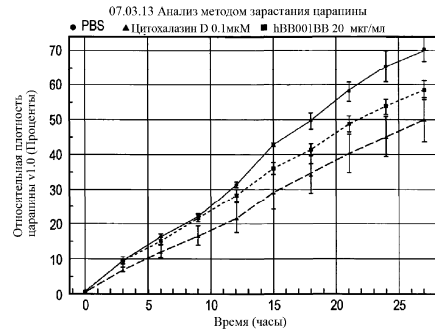
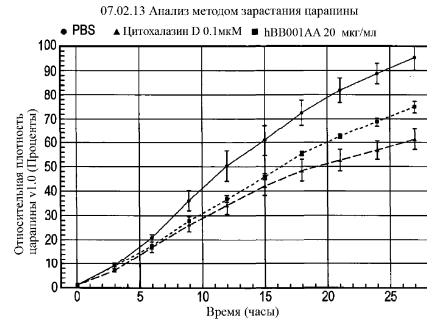


Фиг. 40

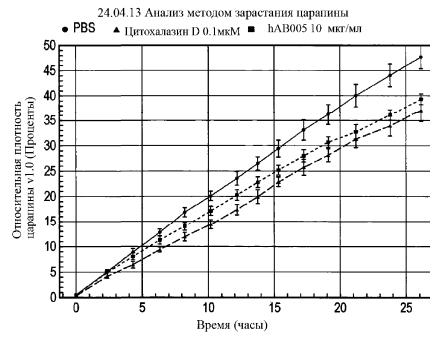


Фиг. 41

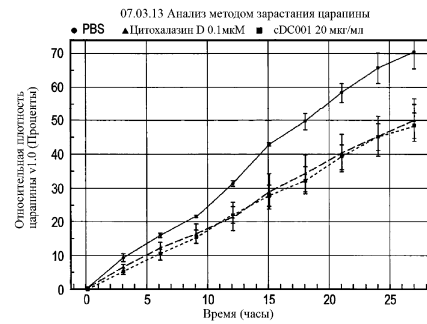




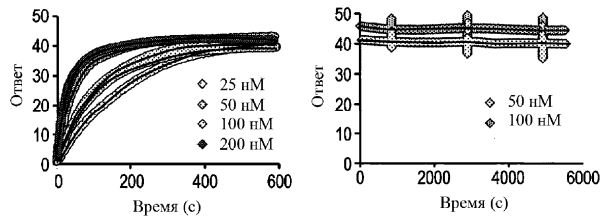
Фиг. 42



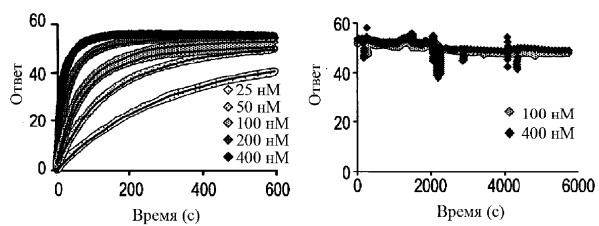
Фиг. 43



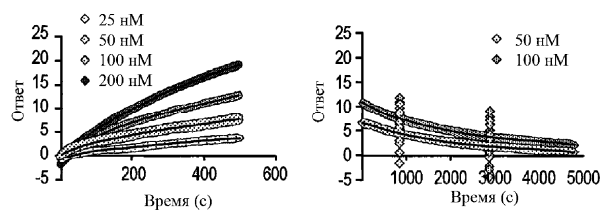
Фиг. 44



Фиг. 45



Фиг. 46



Фиг. 47

