(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201991493 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.30

(22) Дата подачи заявки
2010.12.03

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

(54) АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ЧЕЛОВЕКА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С β-КЛОТО, РЕЦЕПТОРАМИ FGF И ИХ КОМПЛЕКСАМИ

(31) **61/267,321; 61/381,846**
(32) **2009.12.07; 2010.09.10**
(33) **US**
(62) **201691176; 2010.12.03**

(71) Заявитель:
АМГЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ху Шо-Фэнь (US), Фольтц Ян, Кинг Чэдвик Теренс (CA), Ли Ян, Арора Таруна (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М., Глухарёва А.О. (RU)

(57) Изобретение предоставляет композиции и способы, относящиеся к антиген-связывающим белкам, активирующим FGF21-опосредованную передачу сигнала, или производным от этих белков. В различных вариантах воплощения антиген-связывающие белки специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающие белки индуцируют FGF21-подобный сигналлинг. В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающие белки являются полностью принадлежащими человеку, гуманизированными или химерными антителами, связывающими фрагментами и производными таких антител, и полипептидами, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В других вариантах воплощения предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антиген-связывающие белки и их фрагменты, а также производные и полипептиды, клетки, содержащие такие полинуклеотиды, способы получения таких антиген-связывающих белков, их фрагментов и производных, и полипептидов, и способы применения таких антиген-связывающих белков, их фрагментов и производных, и полипептидов, включая способы лечения или диагностики у субъектов, страдающих диабетом 2 типа, ожирением, НАСГ, метаболическим синдромом и родственными нарушениями или состояниями.

201991493 A2

201991493 A2

АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ЧЕЛОВЕКА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С β-КЛОТО, РЕЦЕПТОРАМИ FGF И ИХ КОМПЛЕКСАМИ

Данная заявка испрашивает приоритет согласно временной заявке на патент США № 61/267321 от 7 декабря 2009 г. и временной заявке на патент США № 61/381846 от 10 сентября 2010 г., содержание которых целиком включено сюда посредством отсылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был предоставлен в формате ASCII через сеть интернет с применением шифрованной файловой системы EFS и содержание которого целиком включено в описание посредством отсылки. Указанная копия файла в формате ASCII, созданная 24 ноября 2010 г., названа A-1519-WO-PCT.txt и имеет размер 645894 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим антиген-связывающие белки, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Настоящее изобретение также направлено на создание антиген-связывающих белков, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, включая антиген-связывающие белки, которые индуцируют FGF21-подобный сигналлинг, а также на создание фармацевтических композиций, содержащих антиген-связывающие белки, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, включая антиген-связывающие белки, которые индуцируют FGF21-подобный сигналлинг, и относится к способам лечения нарушения обмена веществ с применением таких

нуклеиновых кислот, полипептидов или фармацевтических композиций. Также предложены способы диагностики с применением антиген-связывающих белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) – это секретируемый полипептид, который принадлежит к подсемейству факторов роста фибробластов (FGF), включающему FGF19, FGF21 и FGF23 (Itoh *et al.*, (2004) *Trend Genet.* 20:563-69). FGF21 является нетипичным представителем FGF, так как его активность не зависит от гепарина, и он функционирует в качестве гормона в процессах регуляции метаболизма глюкозы, липидов и энергетического метаболизма.

Он экспрессируется на высоком уровне в печени и поджелудочной железе и является единственным членом семейства FGF, который в основном экспрессируется в печени. Трансгенные мыши со сверхэкспрессией FGF21 обладают метаболическими фенотипами, характеризующимися медленной скоростью роста, низкими уровнями глюкозы и триглицеридов в плазме и отсутствием связанного с возрастом диабета 2 типа, гиперплазии островковых клеток поджелудочной железы и ожирения. Фармакологическое введение рекомбинантного белка FGF21 в моделях грызунов и приматов приводит к нормализации уровней глюкозы в плазме, снижению уровней триглицеридов и холестерина и улучшению переносимости глюкозы и чувствительности к инсулину. Кроме того, FGF21 вызывает снижение массы тела и объема жировой ткани путем повышения энергозатрат, физической активности и интенсивности метаболизма. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют в пользу фармакологического введения FGF21 для лечения диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии и других метаболических состояний или нарушений у человека.

FGF21 является синтезируемым в печени эндокринным гормоном, который стимулирует поглощение глюкозы адипоцитами и гомеостаз липидов посредством активации их рецептора. Заслуживает

внимания тот факт, что, помимо канонического рецептора для FGF, рецептор для FGF21 также содержит ассоциированный с мембраной β-Клото в качестве существенного кофактора. Активация рецептора FGF21 приводит к множественным эффектам, затрагивающим ряд метаболических параметров.

У млекопитающих FGF опосредуют свое действие через набор из четырех рецепторов для FGF, FGFR1-4, которые, в свою очередь, экспрессируются в виде множества сплайс-вариантов, *например*, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Каждый рецептор для FGF содержит внутриклеточный тирозин-киназный домен, который активируется при связывании лиганда, что приводит к воздействию на расположенные ниже сигнальные пути, включающие белки MAPK (Erk1/2), RAF1, AKT1 и белки STAT. (Kharitonenkov et al., (2008) *BioDrugs* 22:37-44). В некоторых сообщениях было высказано предположение, что "c"-сплайс-варианты рецепторов FGFR1-3 демонстрируют специфичную аффинность в отношении β-Клото и могут действовать как эндогенные рецепторы для FGF21 (Kurosu et al., (2007) *J. Biol. Chem.* 282:26687-26695); Ogawa et al., (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:7432-7437); Kharitonenkov et al., (2008) *J. Cell Physiol.* 215:1-7). В печени, где в большом количестве экспрессируются как β-Клото, так и FGFR4, FGF21 не индуцирует фосфорилирование MAPK, несмотря на прочное связывание FGF21 с комплексом β-Клото-FGFR4. В клетках 3T3-L1 и белой жировой ткани FGFR1, очевидно, является самым распространенным рецептором и поэтому, с наибольшей вероятностью, главные функционально активные рецепторы для FGF21 в этой ткани являются комплексами β-Клото/FGFR1c.

Настоящее изобретение направлено на создание антиген-связывающего белка человека (или гуманизированного антиген-связывающего белка), такого как моноклональное антитело, который индуцирует FGF21-подобный сигналлинг, *например*, агонистического антитела, которое имитирует функциональную активность FGF21. Такое антитело является молекулой с FGF21-

подобной активностью и селективностью, но с дополнительными терапевтически важными характеристиками, типичными для антитела, такими как стабильность белка, отсутствие иммуногенности, простота получения и длительный период полувыведения *in vivo*.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предлагается изолированный антиген-связывающий белок, который индуцирует FGF21-опосредованный сигналлинг.

Также предлагается изолированный антиген-связывающий белок, который специфично связывается по меньшей мере с одним из следующих объектов: (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; и (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, при этом антиген-связывающий белок индуцирует FGF21-опосредованный сигналлинг.

В одном из вариантов воплощения предложенные антиген-связывающие белки содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (a) CDR3 легкой цепи, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (i) последовательности CDR3 легкой цепи, которая отличается в сумме не более чем на три добавленные, замененные и/или делетированные аминокислоты от последовательности CDR3, выбранной из группы, состоящей из последовательностей CDR3 легкой цепи L1-L18, SEQ ID №: 180-194; (ii) QVWDX$_1$X$_2$SDHVV (SEQ ID №: 276); (iii) QQX$_3$GX$_4$X$_5$X$_6$X$_7$T (SEQ ID №: 283); (iv) LQHNSYPLT (SEQ ID №: 267); (v) MQSLQTPFT (SEQ ID №: 268); (vi) QQYNNWPPT (SEQ ID №: 269); (vii) MQSIQLPRT (SEQ ID №: 270); (viii) QQANDFPIT (SEQ ID №: 271); (ix) MQALQTPCS (SEQ ID №: 272); (б) CDR3 тяжелой цепи, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (i) последовательности CDR3 тяжелой цепи, которая отличается в сумме не более чем на четыре добавленные, замененные и/или делетированные аминокислоты от последовательности CDR3, выбранной из группы, состоящей из последовательностей CDR3 тяжелой цепи H1-H18, SEQ ID №: 145-

157; (ii) $X_{34}X_{16}X_{17}X_{18}GX_{19}YYYX_{20}GMDV$ (SEQ ID №: 322); (iii) $SLIVVX_{21}VY\ X_{22}LDX_{23}$ (SEQ ID №: 326); (iv) IVVVPAAIQSYYYYYGMGV (SEQ ID №: 311); (v) DPDGDYYYYGMDV (SEQ ID №: 312); (vi) TYSSGWYVWDYYGMDV (SEQ ID №: 313); (vii) DRVLSYYAMAV (SEQ ID №: 314); (viii) VRIAGDYY YYYGMDV (SEQ ID №: 315); (ix) ENIVVIPAAIFAGWFDP (SEQ ID №: 316) и (x) DRAAAGLHYYYGMDV (SEQ ID №: 317); или (в) последовательности CDR3 легкой цепи по п. (а) и последовательности CDR3 тяжелой цепи по п. (б); где X_1 является G, S или N; X_2 является N, S или T; X_3 является C, Y или S; X_4 является G или S; X_5 является A или S; X_6 является P или F; X_7 является L или отсутствует; X_{34} является I, V или S; X_{16} является L или V; X_{17} является L, T или V; X_{18} является L, V, G или T; X_{19} является A, G или отсутствует; X_{20} является Y, C или D; X_{21} является I или M; X_{22} является A или V; и X_{23} является H или Y; и при этом антиген-связывающий белок специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4.

В другом варианте воплощения предложенные антиген-связывающие белки содержат любую из следующих последовательностей: (а) последовательность CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: (i) CDR1 легкой цепи, которая отличается не более чем на три добавленные, замененные и/или делетированные аминокислоты от последовательности CDR1 из L1-L18, SEQ ID №:158-170; (ii) $RASQ\ X_9\ X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}LA$ (SEQ ID №: 304); (iii) $GGNNIGSX_{15}SVH$ (SEQ ID №: 307); (iv) $RSSQSLLX_{29}X_{30}NGX_{31}X_{32}X_{33}LD$ (SEQ ID №: 310); (v) RASQSVNSNLA (SEQ ID №: 295); (vi) RASQDIRYDLG (SEQ ID №: 296); (vii) RASQGISIWLA (SEQ ID №: 297); и (viii) KSSQSLLQSDGKTYLY (SEQ ID №: 298); (б) последовательность CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: (i) CDR2 легкой цепи, которая отличается не более чем на две добавленные, замененные и/или делетированные аминокислоты от последовательности CDR2 из L1-L18, SEQ ID №:171-179; (ii) $LGSX_{27}RAS$ (SEQ ID №: 290); (iii) $GX_8SX_{28}RAT$ (SEQ

ID №: 294); (iv) AASSLQS (SEQ ID №: 284); (v) GVSTRAT (SEQ ID №: 285); (vi) DDSDRPS (SEQ ID №: 286); (vii) EVSNRFS (SEQ ID №: 287); (в) последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: (i) CDR1 тяжелой цепи, которая отличается не более чем на две добавленные, замененные и/или делетированные аминокислоты от последовательности CDR1 из H1-H18, SEQ ID №:121-131; и (ii) NARMGVX_{39} (SEQ ID №: 352); (iii) X_{40}YGIH (SEQ ID №: 355); (iv) DLSMH (SEQ ID №: 345); (v) DAWMS (SEQ ID №: 346); (vi) TYAMS (SEQ ID №: 347); (vii) SYFWS (SEQ ID №: 348); (viii) SYYWS (SEQ ID №: 131); (ix) SGGYNWS (SEQ ID №: 349); (г) CDR2 тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из: (i) последовательности тяжелой цепи, которая отличается не более чем на три добавленные, замененные и/или делетированные аминокислоты от последовательности CDR2 из H1-H18, SEQ ID №: 132-144; (ii) HIFSNDEKSYSTSLKX_{24} (SEQ ID №: 333); (iii) X_{25}ISGSGVSTX_{26}YADSVKG (SEQ ID №: 338); (iv) VIWYDGSX_{35}KYYX_{36}DSVKG (SEQ ID №: 341); (v) X_{37}IYX_{38}SGSTX$_{41}$YNPSLKS (SEQ ID №: 344); (vi) GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID №: 327); (vii) RIKSKTDGGTTDYAAPVKG (SEQ ID №: 328); (viii) RIYTSGSTNYNPSLKS (SEQ ID №: 329); (ix) RIKSKDGGTTDYAAPVKG (SEQ ID №: 330); (x) RIKSKX_{42}DGGTTDYAAPVKG (SEQ ID №: 483); где X_9 является N или S; X_{10} является V или F; X_{11} является D или S; X_{12} является G или S; X_{13} является S, N или T; X_{14} является S или Y; X_{15} является E или Q; X_{29} является Y или H; X_{30} является Y или S; X_{31} является F или Y; X_{32} является T или N; X_{33} является Y или F; X_{27} является N или D; X_8 является A или T; X_{28} является S или F; X_{39} является S или N; X_{24} является S или N; X_{25} является G или A; X_{26} является H, Y или N; X_{35} является D или I; X_{36} является A или G; X_{37} является N или R; X_{38} является Y или T; X_{41} является Y или N; X_{42} является T или отсутствует; (д) CDR1 легкую цепь по п. (а) и CDR2 легкую цепь по п. (б); (е) CDR1 легкую цепь по п. (а) и CDR1 тяжелую цепь по п. (в); (ж) CDR1 легкую цепь по п. (а) и CDR2 тяжелую цепь по п. (г); (з) CDR1 легкую цепь по п. (б) и CDR1 тяжелую цепь по п. (в); (и) CDR1 тяжелую цепь

по п. (в) и CDR2 тяжелую цепь по п. (г); (к) CDR2 легкую цепь по п. (б) и CDR2 тяжелую цепь по п. (г); (л) CDR1 легкую цепь по п. (а), CDR2 легкую цепь по п. (б) и CDR1 тяжелую цепь по п. (в); (м) CDR2 легкую цепь по п. (б), CDR1 тяжелую цепь по п. (в) и CDR2 тяжелую цепь по п. (г); (н) CDR1 легкую цепь по п. (а), CDR1 тяжелую цепь по п. (в) и CDR2 тяжелую цепь по п. (г); или (о) CDR1 легкую цепь по п. (а), CDR2 легкую цепь по п. (б), CDR2 тяжелую цепь по п. (в), и CDR2 тяжелую цепь по п. (г), при этом указанный антиген-связывающий белок специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4.

В еще одном варианте воплощения предложенные антиген-связывающие белки содержат любую из следующих последовательностей: (а) вариабельный домен легкой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 легкой цепи, выбранную из SEQ ID №: 158-170; (ii) последовательность CDR2 легкой цепи, выбранную из SEQ ID №: 171-179; (iii) последовательность CDR3 легкой цепи, выбранную из SEQ ID №: 180-194; и (б) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID №: 121-131; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID №: 132-144; и (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID №: 145-157; или (в) вариабельный домен легкой цепи по п. (а) и вариабельный домен тяжелой цепи по п. (б), при этом антиген-связывающий белок специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4.

В еще одном варианте воплощения предложенные антиген-связывающие белки содержат любую из следующих последовательностей: (а) последовательность вариабельного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: (i) аминокислот, имеющих последовательность, по меньшей мене на

80% идентичную последовательности вариабельного домена легкой цепи, выбранной из V_L1-V_L18, SEQ ID №: 48-65; (ii) последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность вариабельного домена легкой цепи V_L1-V_L18, SEQ ID №: 48-65; (б) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: (i) аминокислот, имеющих последовательность, по меньшей мене на 80% идентичную последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, выбранной из V_H1-V_H18 из SEQ ID №: 66-84; (ii) последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность вариабельного домена тяжелой цепи V_H1-V_H18, SEQ ID №: 66-84; или (в) вариабельный домен легкой цепи по п. (а) и вариабельный домен тяжелой цепи по п. (б); при этом антиген-связывающий белок специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В некоторых вариантах воплощения предложенные антиген-связывающие белки содержат любую из следующих последовательностей: (а) последовательность вариабельного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: V_L1-V_L18 из SEQ ID №: 48-65; (б) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: V_H1-V_H18 из SEQ ID №: 66-84; или (в) вариабельный домен легкой цепи по п. (а) и вариабельный домен тяжелой цепи по п. (б), при этом антиген-связывающий белок специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В других вариантах воплощения вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи предложенных антиген-

связывающих белков выбраны из группы сочетаний, состоящей из: V_L1V_H1, V_L2V_H2, V_L3V_H3, V_L3V_H4, V_L4V_H5, V_L5V_H6, V_L6V_H7, V_L7V_H8, V_L8V_H8, V_L9V_H9, V_L9V_H10, V_L10V_H11, V_L11V_H11, V_L12V_H12, V_L13V_H13, V_L14V_H14, V_L15V_H15, V_L16V_H16, V_L17V_H17 и V_L18V_H18, при этом антиген-связывающий белок специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В еще одном варианте воплощения предложенные антиген-связывающие белки дополнительно содержат: (а) последовательность консервативной области легкой цепи SEQ ID №: 10; (б) последовательность консервативной области легкой цепи SEQ ID №: 11; (в) последовательность консервативной области тяжелой цепи SEQ ID №: 9; или (г) последовательность консервативной области легкой цепи SEQ ID №: 10 или SEQ ID №: 11 и последовательность консервативной области тяжелой цепи SEQ ID №: 9.

Предложенные антиген-связывающие белки могут принимать множество форм и могут являться, например, антителом человека, гуманизированным антителом, химерным антителом, моноклональным антителом, поликлональным антителом, рекомбинантным антителом, антиген-связывающим фрагментом антитела, одноцепочечным антителом, диателом, триателом, тетрателом, Fab-фрагментом, $F(fab')_2$-фрагментом, доменным антителом, антителом IgD, антителом IgE, антителом IgM, антителом IgG1, антителом IgG2, антителом IgG3, антителом IgG4 или антителом IgG4, несущим по меньшей мере одну мутацию в шарнирной области.

В другом варианте воплощения предложенные антиген-связывающие белки при связывании с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4: (а) связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, в существенной степени с такой же Kd, что и референсное антитело; (б) индуцируют

FGF21-подобный сигналлинг на уровне 10% или более от уровня сигналлинга, индуцированного стандартом FGF21 дикого типа, содержащим зрелую форму SEQ ID №: 2, согласно измерению с помощью ELK-люциферазного репортерного анализа; (в) демонстрируют EC50, равную 10 нМ или менее для FGF21-подобного сигналлинга при проведении анализа способом, выбранным из группы, состоящей из: (i) опосредованного FGFR1c/β-Клото анализа *in vitro* с применением рекомбинантных клеток; и (ii) функционального анализа *in vitro* с применением адипоцитов человека; (г) демонстрируют EC50, равную менее чем 10 нМ для агонистической активности в отношении FGFR1c в присутствии β-Клото при репортерном анализе *in vitro,* опосредованном рекомбинантным рецептором FGFR1c; и (д) демонстрируют EC50 более чем 1 мкМ для агонистической активности в отношении FGFR1c в отсутствие β-Клото при репортерном анализе *in vitro,* опосредованном рекомбинантным рецептором FGFR1c; или (е) конкурируют с референсным антителом за связывание с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, при этом референсное антитело содержит сочетание последовательностей вариабельных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, выбранное из группы, состоящей из V_L1V_H1, V_L2V_H2, V_L3V_H3, V_L3V_H4, V_L4V_H5, V_L5V_H6, V_L6V_H7, V_L7V_H8, V_L8V_H8, V_L9V_H9, V_L9V_H10, V_L10V_H11, V_L11V_H11, V_L12V_H12, V_L13V_H13, V_L14V_H14, V_L15V_H15, V_L16V_H16, V_L17V_H17 и V_L18V_H18. В других вариантах воплощения предложенные антиген-связывающие белки при связывании с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4: (а) снижают уровень глюкозы в крови в модели животных; (б) снижают уровни липидов в сыворотке в модели животных; (в) снижают уровни инсулина в модели животных; или (г) демонстрируют два или более из пунктов (а) и (б), и (в).

В конкретных примерах воплощения предложенные антиген-связывающие белки содержат: (а) тяжелую цепь, содержащую одну из SEQ ID №:31, 32, 390-401, 404-405; (б) легкую цепь, содержащую одну из SEQ ID №: 13, 14, 385-389, 402-403; или (в) сочетание, состоящее из тяжелой цепи по п. (а) и легкой цепи по п. (б).

Также предложены антиген-связывающие белки, которые способны связываться с β-Клото дикого типа человека (SEQ ID №: 7), но которые не связываются с химерной формой β-Клото, при этом химерная форма β-Клото содержит каркас β-Клото человека, где последовательности β-Клото мыши замещают остатки белка дикого типа человека по меньшей мере по одному из (а) положений 1-80; (б) положений 303-522; (в) положений 852-1044; и (г) их комбинаций.

Согласно другого аспекта настоящее изобретение направлено на создание антиген-связывающих белков, которые способны связываться с β-Клото дикого типа человека (SEQ ID №: 7) по меньшей мере по одному из (а) положений 1-80; (б) положений 303-522; (в) положений 852-1044; и (г) их комбинаций.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение направлено на создание антиген-связывающих белков, которые способны конкурировать с антиген-связывающим белком по любому из пп. 8 или 13 за связывание с остатками в составе β-Клото дикого типа человека по меньшей мере по одному из (а) положений 1-80; (б) положений 303-522; (в) положений 852-1044; и (г) их комбинаций.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая один или несколько антиген-связывающих белков, предложенных здесь, в смеси с фармацевтически приемлемым их носителем.

Согласно еще одному аспекту предложены изолированные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют антиген-связывающие белки, описанные здесь. В некоторых случаях изолированные молекулы нуклеиновых кислот функционально присоединены к регуляторной последовательности. В вариантах воплощения такие

нуклеиновые кислоты содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, вариабельный домен тяжелой цепи или оба эти домена антиген-связывающего белка, представленного здесь. В некоторых вариантах воплощения нуклеиновые кислоты содержат (а) V_L1-V_L18 (SEQ ID №: 48-65); (б) V_H1-V_H18 (SEQ ID №: 66-84); или (в) одну или несколько последовательностей по п. (а) и одну или несколько последовательностей по п. (б).

Согласно еще одному аспекту предложены экспрессионные векторы и клетки-хозяева, трансформированные или трансфецированные экспрессионными векторами, которые содержат вышеуказанные изолированные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антиген-связывающие белки, описанные здесь.

Согласно еще одному аспекту также предложены способы получения антиген-связывающих белков, которые специфично или избирательно связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и которые включают этап получения антиген-связывающих белков из клетки-хозяина, которая секретирует антиген-связывающий белок.

В других воплощениях предложен способ профилактики или лечения состояния у субъекта, которому требуется такое лечение, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, предложенной здесь, при этом лечение состояния происходит за счет снижения уровней глюкозы в крови, инсулина или липидов в сыворотке. В вариантах воплощения состояние является диабетом 2 типа, ожирением, дислипидемией, НАСГ, сердечно-сосудистым заболеванием или метаболическим синдромом.

Эти и другие аспекты более подробно описаны здесь. Каждый из предложенных аспектов может включать различные воплощения, предложенные здесь. Таким образом, предполагается, что каждый из вариантов воплощения, включающий один элемент или сочетание элементов, может быть отнесен к каждому описанному аспекту, и

все такие сочетания вышеуказанных аспектов и вариантов воплощения специально рассматриваются. Другие особенности, объекты и преимущества раскрытых антиген-связывающих белков и связанных с ними способов и композиций станут очевидны из следующего далее детального описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фигуре 1A-1B представлено выравнивание, демонстрирующее гомологию последовательностей между FGFR1c человека (номер доступа в GenBank P11362; SEQ ID №: 356) и FGFR1c мыши (номер доступа в GenBank NP_034336; SEQ ID №: 357); а также выделены различные структурные особенности, включая сигнальный пептид, трансмембранную последовательность, область связывания с гепарином, и приведена консенсусная последовательность (SEQ ID №: 358).

На фигуре 2A-2C представлено выравнивание, демонстрирующее гомологию последовательностей между β-Клото человека (номер доступа в GenBank NP_783864; SEQ ID №: 359) и β-Клото мыши (номер доступа в GenBank NP_112457; SEQ ID №: 360); а также выделены различные структурные особенности, включая трансмембранную последовательность и два гликозилгидролазных домена, и приведена консенсусная последовательность (SEQ ID №: 361).

На фигуре 3 показан полученный способом проточной цитометрии профиль клеток, окрашенных с применением FGF21-Alexa 647, которые применяли в качестве иммуногена для получения антиген-связывающих белков; фигура демонстрирует уровень экспрессии FGF21R (комплекса, содержащего FGFR1c и β-Клото) и связывание с FGF21.

На фиг. 4 показана последовательность (SEQ ID №: 362), демонстрирующая белок со сшивками с Fc, который применяли в качестве иммуногена для получения антиген-связывающих белков; иммуноген содержит внеклеточный домен (ECD) из состава FGFR1c человека, сшитый с Fc из состава IgG1 через Gly_5-линкер (SEQ ID

№: 379); соответствующий FGFR1c-компонент указан заглавными буквами, линкер указан курсивом с подчеркиванием, а Fc указан строчными буквами.

На фиг. 5 показана последовательность (SEQ ID №: 363), демонстрирующая химерный белок с Fc, который применяли в качестве иммуногена для получения антиген-связывающих белков; иммуноген содержит внеклеточный домен (ECD) из состава β-Клото человека, сшитый с Fc из состава IgG1 через Gly_5-линкер (SEQ ID №: 379); соответствующий β-Клото компонент указан заглавными буквами, линкер указан курсивом с подчеркиванием, а Fc указан строчными буквами.

На фигуре 6 представлен ПААГ гель с ДСН, демонстрирующий степень очистки, достигнутую при получении растворимого комплекса рецептора для FGF21, содержащего FGFR1c ECD-Fc и β-Клото ECD-Fc, который применяли в качестве иммуногена для получения антиген-связывающих белков.

На фигуре 7 представлена серия графиков, полученных в результате ELK-люциферазного репортерного анализа, описанного здесь, проведенного для клона 2E10 рекомбинантных клеток CHO, которая демонстрирует способность некоторых антиген-связывающих белков индуцировать FGF21-подобный сигналлинг в рекомбинантных клетках CHO, экспрессирующих комплекс рецептора для FGF21, содержащий FGFR1c и β-Клото.

На фигуре 8 представлена серия графиков, полученных в результате анализа фосфорилирования ERK1/2, описанного здесь, которая демонстрирует способность некоторых антиген-связывающих белков индуцировать FGF21-подобный сигналлинг в клетках L6 крысы. По оси X отложена концентрация антиген-связывающих белков, а по оси Y – процент фосфорилированного ERK1/2 от суммарного количества ERK1/2.

На фигуре 9 представлена серия графиков, полученных в результате анализа фосфорилирования ERK1/2, описанного здесь, которая демонстрирует, что опосредованный антиген-связывающими

белками FGF21-подобный сигналлинг в клетках L6 специфичен к FGFR1c/β-Клото.

На фигуре 10 представлена серия графиков, полученных в результате анализа фосфорилирования ERK, описанного здесь, которая демонстрирует способность некоторых антиген-связывающих белков индуцировать FGF21-подобный сигналлинг в адипоцитах человека.

На фигуре 11A представлена серия сенсограмм связывания (зависимость ответа от времени), демонстрирующая, что некоторые из антиген-связывающих белков, индуцирующих FGF21-опосредованный сигналлинг, связываются с β-Клото человека по двум различным, но частично перекрывающимся, сайтам связывания, и представлены 24H11 (группа A) и 17D8 (группа B), тогда как антиген-связывающие белки, которые не индуцируют FGF21-опосредованный сигналлинг (2G10, 1A2), не связываются с этими сайтами.

На фигуре 11B показана серия сенсограмм связывания (зависимость ответа от времени), демонстрирующая третий сайт связывания на β-Клото человека, который был идентифицирован для антиген-связывающих белков группы C, представленных 39F7.

На фигуре 12 представлена серия сенсограмм связывания (зависимость ответа от времени), демонстрирующая, что некоторые из антиген-связывающих белков (12E4, 24H11, 17C3, 18B11), которые индуцируют FGF21-опосредованный сигналлинг, препятствуют связыванию β-Клото с FGF21, тогда как другие антиген-связывающие белки (21H2, 17D8, 18G1) не препятствуют такому связыванию.

На фигуре 13 представлено выравнивание вариабельных областей некоторых из антиген-связывающих белков, которые были получены; указаны каркасная область и области CDR. Фигура 13 раскрывает SEQ ID №№: 364, 59, 365, 60, 366, 61, 367, 62, 368, 57, 369, 55, 51-52, 56, 56, 53-54, 63-65, 370, 58, 371, 50, 50, 49, 48, 372, 78, 373, 66-69, 79, 374, 76, 81, 375, 70, 73,

73, 71-72, 376, 83, 82, 84, 377, 80, 378, 75 и 74, соответственно, в порядке появления.

На фигуре 14 представлена диаграмма, графически изображающая дизайн исследования длительностью 68 дней, проводимого с участием страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 15 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на потребление пищи до полудня исследуемыми страдающими ожирением *яванскими* макаками.

На фигуре 16 представлены два графика, изображающих влияние носителя и 16H7 на потребление фруктов и потребление пищи после полудня исследуемыми страдающими ожирением *яванскими* макаками.

На фигуре 17 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на массу тела исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 18 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на индекс массы тела (BMI) исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 19 представлен график, изображающий влияние носителя на окружность живота (AC) исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 20 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на толщину кожной складки (SFT) исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 21 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на уровни глюкозы, согласно пробе на переносимость глюкозы, у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 22 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на уровни инсулина в плазме, согласно пробе на переносимость глюкозы, у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 23 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на содержание глюкозы в плазме натощак у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 24 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на содержание инсулина в плазме натощак у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 25 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на содержание глюкозы в плазме после еды у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 26 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на содержание инсулина в плазме после еды у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 27 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на содержание триглицеридов в плазме натощак у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 28 представлен график, изображающий влияние носителя и 16H7 на содержание триглицеридов в плазме после еды у исследуемых страдающих ожирением *яванских* макаков.

На фигуре 29 приведено схематическое изображение химерных белков β-Клото мышь-человек, которые были сконструированы и применялись для изучения связывания антиген-связывающих белков.

На фигуре 30 приведено схематическое изображение химерных белков β-Клото мышь-человек, которые были сконструированы, а также указаны качественные данные по связыванию для FGF21, 16H7, 37D3 и 39F7.

На фигурах 31A-C представлена серия графиков, изображающих данные по связыванию для восьми вариантов белков 16H7 и 22H5, которые были сконструированы, а также для 22H5 и 16H7.

На фигурах 32A-C представлена серия графиков, изображающих результаты анализа ELISA, который применяли для демонстрации того, что несколько вариантов белков 22H5 и 16H7 обладают способностью к связыванию.

На фигуре 33 представлена столбчатая диаграмма, сравнивающая скорости диссоциации для нескольких вариантов 22H5 и 16H7, которые были получены.

На фигуре 34 приведены два графика, изображающих кривые связывания для 39F11 при титровании с применением FGF21 и для FGF21 при титровании с применением 39F11; графики демонстрируют наличие аддитивного эффекта.

На фигуре 35 приведены два графика, изображающих кривые связывания для 16H7 при титровании с применением 39F11 и для 39F11 при титровании с применением 16H7; графики демонстрируют наличие аддитивного эффекта.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заголовки разделов, используемые здесь, предназначены исключительно для организационных целей и не должны рассматриваться как лимитирующие описываемый объект.

Если здесь не указано иначе, научные и технические термины, которые применяются в связи с настоящей заявкой, будут иметь значения, которые общепризнанны специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не требуется в соответствии с контекстом, термины в единственном числе будут включать термины во множественном числе, а термины во множественном числе будут включать термины в единственном числе.

В общем случае номенклатура и методики, используемые в связи с клеточной и тканевой культурой, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот, а также гибридизацией нуклеиновых кислот, описываемые здесь, являются номенклатурой и методиками, хорошо известными и стандартно применяемыми в данной области техники. Способы и методики в настоящей заявке в общем случае выполняют в соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые процитированы и обсуждены в тексте настоящего описания изобретения, если не указано иначе. *См., например,* Sambrook *et al,* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

(2001), Ausubel *et al*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены сюда в качестве ссылок. Ферментативные реакции и методики очистки проводят согласно указаниям производителей, как это принято в данной области техники или описано здесь. Терминология, лабораторные процедуры и методики, связанные с аналитической химией, синтетической органической химией и медицинской и фармацевтической химией, описанные здесь, являются таковыми, которые хорошо известны и стандартно применяются в данной области техники. Стандартные методики могут применяться для химического синтеза, химического анализа, приготовления фармацевтических препаратов, лекарственных форм и их доставки, а также для лечения пациентов.

Следует понимать, что рассматриваемое изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реагентами, и т.д., описанными здесь, и, в связи с этим, может варьировать. Использованная здесь терминология предназначена только для целей описания частных вариантов воплощения и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения.

За исключением конкретных примеров или если не указано иначе, все числительные, выражающие количество ингредиентов или условия проведения реакций, используемые здесь, следует понимать во всех случаях как модифицированные термином "примерно". Термин "примерно" при использовании в связи с процентными отношениями может означать ±5%, *например*, 1%, 2%, 3% или 4%.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

При использовании в этом документе термины в единственном числе означают "один или более", если явно не указано иначе.

"Антиген-связывающий белок" – это белок, содержащий часть, которая связывается с антигеном или мишенью, необязательно, скаффолд или каркасную часть, которая позволяет антиген-связывающей части принимать конформацию, способствующую связыванию антиген-связывающего белка с антигеном. Примеры антиген-связывающих белков включают антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантное антитело, одноцепочечное антитело, диатело, триатело, тетратело, Fab-фрагмент, $F(ab')_2$-фрагмент, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4 и их фрагменты. Антиген-связывающий белок может содержать, например, другой белковый каркас или искусственно созданный каркас с пересаженными областями CDR или производными областей CDR. Такие каркасы включают, но не ограничиваются ими, полученные из антител каркасы, содержащие мутации, внесенные, например, для стабилизации пространственной структуры антиген-связывающего белка, а также полностью синтетические каркасы, содержащие, например, биосовместимый полимер. *См., например*, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics,* 53(1): 121-129 (2003); Roque et al., *Biotechnol. Prog.* 20:639-654 (2004). Кроме того, могут применяться пептидные миметики антител ("PAM"), а также каркасы на основе миметиков антител с применением фибронектиновых компонентов в качестве каркаса.

Антиген-связывающий белок может обладать, например, структурой иммуноглобулина природного происхождения. "Иммуноглобулин" является тетрамерной молекулой. В иммуноглобулине природного происхождения каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара включает одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область из примерно 100-110 или более аминокислот, отвечающую в основном за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи устанавливает границы консервативной области,

несущей основную ответственность за эффекторную функцию. У человека легкие цепи классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA или IgE, соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей вариабельные и консервативные области соединены "J"-областью длиной примерно 12 аминокислот, а в состав тяжелой цепи также входит "D"-область длиной примерно 10 аминокислот. В общем случае см. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки). Вариабельные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют сайт связывания в составе антитела, таким образом, что интактный иммуноглобулин имеет два сайта связывания.

Цепи иммуноглобулинов природного происхождения демонстрируют одну и ту же общую структуру с относительно консервативными каркасными областями (FR), соединенными тремя гипервариабельными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность, или CDR. В порядке следования от N-конца к С-концу как легкая, так и тяжелая цепи содержат домены FR1, CDRl, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Обозначение аминокислот в каждом домене можно производить согласно нумерации по Кабату (Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication №. 91-3242, 1991). При необходимости области CDR также можно дополнительно определять в соответствии с альтернативной схемой номенклатуры, такой как схема Клотиа (см. Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883 или Honegger & Pluckthun, 2001, J. *Mol. Biol.* 309:657-670).

В контексте рассматриваемого изобретения говорят, что антиген-связывающий белок "специфично связывается" или "избирательно связывается" со своим целевым антигеном, когда константа диссоциации (K_D) составляет $\leq 10^{-8}$ М. Антитело специфично

связывается с антигеном с "высокой аффинностью", когда K_D составляет $\leq 5x10^{-9}$ М, и с "очень высокой аффинностью", когда K_D составляет $\leq 5x10^{-10}$ М. В одном из вариантов воплощения антитела будут связываться с FGFR1c, β-Клото, как с FGFR1c, так и с β-Клото или с комплексом, содержащим FGFR1c и β-Клото, включая FGFR1c человека, β-Клото человека, или как FGFR1c человека, так и β-Клото человека с K_D, имеющей значение примерно от 10^{-7} М до 10^{-12} М, и в еще одном варианте воплощения антитела будут связываться с $K_D \leq 5x10^{-9}$.

"Антитело" означает интактный иммуноглобулин или его антиген-связывающую часть, которая конкурирует с интактным антителом за специфичное связывание, если не указано иначе. Антиген-связывающие части могут быть получены с применением методик рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антиген-связывающие части включают, *среди прочего,* Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, доменные антитела (dAb), фрагменты, включающие области, определяющие комплементарность (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для придания полипептиду свойства специфичного антиген-связывания.

Fab-фрагмент – это моновалентный фрагмент, содержащий домены V_L, V_H, C_L и C_H1; $F(ab')_2$-фрагмент – это бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент содержит домены V_H и C_H1; Fv-фрагмент содержит домены V_L и V_H одного плеча антитела, и dAb-фрагмент содержит домен V_H, домен V_L или антиген-связывающий фрагмент домена V_H или V_L (патенты США №№ 6846634, 6696245, опубликованные заявки США №№ 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward et al, Nature 341:544-546(1989)).

Одноцепочечное антитело (scFv) – это антитело, в котором области V_L и V_H объединены посредством линкера (например,

синтетической последовательностью аминокислотных остатков) с образованием непрерывной белковой цепи, при этом линкер имеет длину, достаточную для того, чтобы белковая цепь могла сложиться сама на себя и образовать моновалентный антиген-связывающий сайт (см., например, Bird et al, *Science* 242:423-26 (1988) и Huston et al, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83 (1988)). Диатела – это бивалентные антитела, содержащие две полипептидные цепи, при этом каждая полипептидная цепь содержит домены V_H и V_L, соединенные линкером, который слишком краток для того, чтобы могли образовать пару два домена на одной и той же цепи, таким образом, создается возможность образования пары между каждым доменом одной цепи и комплементарным доменом на другой полипептидной цепи (см., например, Holliger et al, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993), и Poljak et al, *Structure* 2:1121-23 (1994)). Если две полипептидные цепи диатела идентичны, то образовавшееся при их спаривании диатело будет содержать два идентичных антиген-связывающих сайта. Полипептидные цепи, имеющие разные последовательности, могут применяться для создания диатела с двумя разными антиген-связывающими сайтами. Аналогично триатела и тетратела – это антитела, содержащие три и четыре полипептидные цепи, соответственно, и образующие три или четыре антиген-связывающих сайта, соответственно, которые могут быть одинаковыми или разными.

Области, определяющие комплементарность (CDR), и каркасные области (FR) данного антитела можно идентифицировать с помощью системы, описанной в работе Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication №. 91-3242, 1991. В случае необходимости области CDR также можно дополнительно определять в соответствии с альтернативной схемой номенклатуры, такой как схема Клотиа (см. Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al*, 1989, *Nature*

342:878-883 или Honegger & Pluckthun, 2001, *J. Mol. Biol.* 309:657-670). Одна или несколько областей CDR могут быть внедрены в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно с образованием антиген-связывающего белка. Антиген-связывающий белок может содержать область(и) CDR как часть более длинной полипептидной цепи, в нем область(и) CDR могут быть ковалентно присоединены к другой полипептидной цепи или область(и) CDR могут быть присоединены нековалентно. Области CDR позволяют антиген-связывающему белку специфично связываться с определенным представляющим интерес антигеном.

Антиген-связывающий белок может содержать один или более сайтов связывания. Если присутствует более одного сайта связывания, то сайты связывания могут быть идентичными друг другу или могут быть разными. Например, иммуноглобулины человека природного происхождения в типичном случае содержат два идентичных сайта связывания, тогда как "биспецифичное" или "бифункциональное" антитело содержит два разных сайта связывания.

Термин "антитело человека" включает все антитела, которые содержат одну или несколько вариабельных и консервативных областей, происходящих от последовательностей иммуноглобулинов человека. В одном из вариантов воплощения все вариабельные и консервативные домены происходят от последовательностей иммуноглобулинов человека (антитело, полностью принадлежащее человеку). Эти антитела могут быть получены различными способами, примеры которых описаны ниже, включая способ с применением иммунизации представляющим интерес антигеном мыши, которая генетически модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать антитела, происходящие от генов, кодирующих тяжелую и/или легкую цепь человека, такой как мышь, полученная с применением систем Xenomouse®, UltiMab™ или Velocimmune®. Также можно применять подходы на основе фагов.

Гуманизированное антитело имеет последовательность, которая отличается от последовательности антитела, полученного от

биологического вида, отличающегося от человека, на одну или несколько аминокислотных замен, делеций и/или вставок, таким образом, что гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее тяжелый иммунный ответ по сравнению с антителом биологического вида, отличающегося от человека, при введении субъекту, являющемуся человеком. В одном из вариантов воплощения определенные аминокислоты в составе каркасных и консервативных доменов тяжелой и/или легкой цепей антитела биологического вида, отличающегосяо от человека, подвергнуты мутациям с получением гуманизированного антитела. В другом варианте воплощения консервативный(ые) домен(ы) из антитела человека сшит(ы) с вариабельным(и) доменом(ами), принадлежащим(и) биологическому виду, отличающемуся от человека. В другом варианте воплощения один или более аминокислотных остатков в одной или более последовательностях CDR антитела, принадлежащего биологическому виду, отличающемуся от человека, изменены для снижения вероятной иммуногенности антитела, принадлежащего биологическому виду, отличающемуся от человека, при его введении субъекту, являющемуся человеком, при этом либо измененные аминокислотные остатки не критичны для иммуноспецифичного связывания антитела с антигеном, либо произведенные изменения аминокислотной последовательности являются консервативными изменениями, такими, что связывание гуманизированного антитела с антигеном в существенной степени не ухудшается по сравнению со связыванием антитела, не принадлежащего человеку, с антигеном. Примеры получения гуманизированных антител можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293.

Термин "химерное антитело" означает антитело, которое содержит одну или более областей из одного антитела и одну или более областей из одного или более других антител. В одном из вариантов воплощения одна или более областей CDR происходят из антитела человека, которое связывается с (i) β-Клото; (ii)

FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В другом варианте воплощения все области CDR происходят от антитела человека, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В другом варианте воплощения области CDR из более чем одного антитела человека, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, перемешаны и соединены в химерном антителе. Например, химерное антитело может содержать CDR1 из легкой цепи первого антитела человека, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4; CDR2 и CDR3 из легкой цепи второго антитела человека, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, а также содержит области CDR из тяжелой цепи третьего антитела, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Кроме того, каркасные области могут происходить от одних и тех же антител, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, от одного или нескольких различных антител, таких как антитело человека, или от гуманизированного антитела. В одном примере химерного антитела часть тяжелой и/или легкой цепи идентична, гомологична или происходит от антитела, происходящего от конкретного биологического вида или принадлежащего к конкретному классу или подклассу антител, тогда как оставшаяся часть цепи (цепей) идентична, гомологична или происходит от

антитела или антител из другого биологического вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител. Также включены фрагменты таких антител, которые демонстрируют требуемую биологическую активность *(например,* способность специфично связываться с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4).

Термин "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает домен вариабельной области V_L и домен консервативной области C_L. Домен вариабельной области легкой цепи расположен на амино-конце полипептида. Легкие цепи включают каппа ("к") цепи и лямбда ("λ") цепи.

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен вариабельной области V_H и три домена консервативной области, C_H1, C_H2 и C_H3. Домен V_H расположен на амино-конце полипептида, и домены C_H расположены на карбокси-конце, при этом C_H3 расположен ближе всего к карбокси-концу полипептида. Тяжелые цепи могут принадлежать к любому изотипу, включая IgG (в том числе подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (в том числе подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Термин "иммунологически функциональный фрагмент" (или просто "фрагмент") антиген-связывающего белка, *например,* антитела или цепи иммуноглобулина (тяжелой или легкой цепи), при использовании здесь, означает антиген-связывающий белок, содержащий часть (независимо от того, как эта часть получена или синтезирована) антитела, у которой отсутствуют по меньшей мере некоторые из аминокислот, присутствующих в полноразмерной цепи, но которая способна специфично связываться с антигеном. Такие фрагменты биологически активны в том смысле, что они

специфично связываются с целевым антигеном и могут конкурировать с другими антиген-связывающими белками, включая интактные антитела, за специфичное связывание с данным антигеном. Согласно одному аспекту изобретения такой фрагмент будет сохранять по меньшей мере одну область CDR, присутствующую в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, и в некоторых вариантах воплощения будет содержать единичную тяжелую цепь и/или легкую цепь, или их часть. Биологически активные фрагменты могут быть получены с применением методик рекомбинантных ДНК или могут быть получены с помощью ферментативного или химического расщепления антиген-связывающих белков, включая интактные антитела. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулинов включают, не ограничиваясь этим, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, доменные антитела и одноцепочечные антитела и могут происходить из любого источника, представленного биологическим видом, принадлежащим к млекопитающим, включая, но не ограничиваясь этим, человека, мышь, крысу, верблюдовых или кролика. Дополнительно предполагается, что функциональная часть антиген-связывающих белков, раскрытых здесь, например, одна или более областей CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или с низкомолекулярной молекулой с образованием терапевтического агента, нацеленного на конкретную мишень в организме и обладающего бифункциональными терапевтическими свойствами или имеющего удлиненный период полувыведения из сыворотки.

Область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, включающих домены C_H2 и C_H3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или несколькими дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов C_H3.

"Fab'-фрагмент" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая включает домен V_H и домен C_H1, а также область между доменами C_H1 и C_H2, таким образом, что между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может быть

образована межцепочечная дисульфидная связь с формированием молекулы $F(ab')_2$.

"$F(ab')_2$-фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, включающие часть консервативной области между доменами C_H1 и C_H2, таким образом, что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, $F(ab')_2$-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

"Область Fv" содержит вариабельные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но у нее отсутствуют консервативные области.

"Доменное антитело" – это иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. В некоторых случаях две или несколько областей V_H ковалентно соединены посредством пептидного линкера с образованием бивалентного доменного антитела. Две области V_H бивалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или на разные антигены.

"Полуантитело" – это иммунологически функциональная конструкция иммуноглобулина, содержащая полную тяжелую цепь, полную легкую цепь и Fc-область второй тяжелой цепи, спаренную с Fc-областью полной тяжелой цепи. Необязательно может быть использован линкер для соединения Fc-области тяжелой цепи и второй Fc-области тяжелой цепи. В некоторых вариантах воплощения полуантитело является моновалентной формой антиген-связывающего белка, раскрытого здесь. В других вариантах воплощения могут применяться пары несущих заряд остатков для ассоциации одной Fc-области со второй Fc-областью. Fc-область второй тяжелой цепи может содержать, например, SEQ ID №: 441, и может быть соединена с легкой цепью через *(например,* SEQ ID №: 440). Пример тяжелой цепи полуантитела содержит последовательность SEQ ID №: 453.

"Бивалентный антиген-связывающий белок" или "бивалентное антитело" содержит два антиген-связывающих сайта. В некоторых случаях два сайта связывания имеют одинаковые антигенные специфичности. Бивалентные антиген-связывающие белки и бивалентные антитела могут быть биспецифичными, как описано здесь.

"Мультиспецифичный антиген-связывающий белок" или "мультиспецифичное антитело" – это белок или антитело, которые нацелены более чем на один антиген или эпитоп.

"Биспецифичные", "с двойной специфичностью" или "бифункциональные" антиген-связывающий белок или антитело – это гибридные антиген-связывающий белок или антитело, соответственно, содержащие два различных антиген-связывающих сайта. Биспецифичные антиген-связывающие белки и антитела являются разновидностью мультиспецифичного антиген-связывающего белка или антитела и могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, слияние гибридов или сшивку Fab'-фрагментов. *См., например,* Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553. Два сайта связывания биспецифичного антиген-связывающего белка или антитела будут связываться с двумя различными эпитопами, которые могут располагаться на одной и той же или на разных белковых мишенях.

Термины "FGF21-подобный сигналлинг" и "индуцирует FGF21-подобный сигналлинг" применительно к антиген-связывающему белку по настоящему изобретению означают, что антиген-связывающий белок имитирует или модулирует биологический эффект *in vivo,* индуцируемый связыванием (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и индуцирует биологический ответ, который, в ином случае, был бы вызван в результате связывания FGF21 с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii)

комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, *in vivo*. При оценке связывания и специфичности антиген-связывающего белка, *например,* антитела или его иммунологически функционального фрагмента, полагают, что антитело или фрагмент индуцируют биологический ответ, если ответ равен или является более сильным, чем 5%, и, предпочтительно, равен или является более сильным, чем 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, относительно активности стандарта FGF21 дикого типа, содержащего зрелую форму SEQ ID №: 2 *(т.е,* зрелую форму последовательности FGF21 человека), и имеет следующие свойства: демонстрирует уровень эффективности, равный или выше 5% от стандарта FGF21, со значением EC50, равным или ниже 100 нМ, например, 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ или 10 нМ при исследовании с применением (1) люциферазного репортерного анализа клеток, опосредуемого рекомбинантным рецептором для FGF21, из примера 5; (2) анализа клеток по опосредуемому рекомбинантным рецептором для FGF21 фосфорилированию ERK из примера 5; и (3) анализа фосфорилирования ERK в адипоцитах человека, как описано в примере 7. "Эффективность" антиген-связывающего белка определяют как демонстрацию значения EC50, равного или менее 100 нМ, например, 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ и, предпочтительно, менее 10 нМ антиген-связывающего белка при проведении следующих типов анализа: (1) люциферазного репортерного анализа клеток, опосредуемого рекомбинантным рецептором для FGF21, из примера 5; (2) анализа клеток по опосредуемому рекомбинантным рецептором для FGF21 фосфорилированию ERK из примера 5; и (3) анализа фосфорилирования ERK в адипоцитах человека, как описано в примере 7.

Следует отметить, что не все антиген-связывающие белки по настоящему изобретению индуцируют FGF21-опосредованный сигналлинг, а также что это свойство не является необходимым

во всех случаях. Тем не менее, антиген-связывающие белки, которые не индуцируют FGF21-опосредованный сигналлинг, относятся к особенностям настоящего изобретения и могут быть полезны в качестве диагностических реагентов или для других применений.

При использовании в этом документе термин "FGF21R" означает мультимерный рецепторный комплекс, о котором известно или предполагается, что он формируется FGF21 *in vivo*. В различных вариантах воплощения FGF21R содержит (i) FGFR, *например*, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, и (ii) β-Клото.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как одноцепочечные, так и двуцепочечные полимеры нуклеотидов. Нуклеотиды, входящие в состав полинуклеотида, могут являться рибонуклеотидами или дезоксирибонуклеотидами, или модифицированной формой любого типа нуклеотидов. Указанные модификации включают модификации азотистого основания, такие как производные бромуридина и инозина, модификации рибозы, такие как 2', 3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных мостиков, такие как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфораниладат и фосфороамидат.

Термин "олигонуклеотид" означает полинуклеотид, содержащий 200 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения олигонуклеотиды имеют длину от 10 до 60 оснований. В других вариантах воплощения олигонуклеотиды имеют длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или от 20 до 40 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двуцепочечными, *например*, для применения при конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут быть смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами. Олигонуклеотид может содержать маркер в том числе радиоактивный маркер, флуоресцентный маркер, гаптеновый или антигенный маркер, для детекции при проведении анализа. Олигонуклеотиды могут применяться, например, в качестве

праймеров для ПЦР, праймеров для клонирования или зондов для гибридизации.

"Изолированная молекула нуклеиновой кислоты" означает ДНК или РНК геномного происхождения, из мРНК, из кДНК, или синтетического происхождения, или какие-либо их сочетания, которые не ассоциированы со всем полинуклеотидом или с частью полинуклеотида, в котором изолированный полинуклеотид обнаруживается в природе, или которые соединены с полинуклеотидом, с которым они не соединены в природе. Для целей настоящего изобретения подразумевается, что "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность, не содержит интактные хромосомы. Изолированные молекулы нуклеиновых кислот, "содержащие" заданные последовательности нуклеиновых кислот, могут включать, в дополнение к заданным последовательностям, кодирующие последовательности для вплоть до десяти или даже вплоть до двадцати других белков или их частей или могут включать функционально присоединенные регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией кодирующей области перечисленных последовательностей нуклеиновых кислот, и/или могут включать последовательности векторов.

Если не указано иначе, расположенный слева конец любой одноцепочечной полинуклеотидной последовательности, обсуждаемой здесь, является 5'-концом; направление в левую сторону двуцепочечной полинуклеотидной последовательности обозначается как направление в сторону 5'-конца. Направление от 5'- до 3'-конца при добавлении нуклеотидов к образующемуся РНК-транскрипту обозначается как направление транскрипции; области последовательности в составе нити ДНК, имеющей ту же последовательность, что и РНК-транскрипт, расположенные в 5'-области относительно 5'-конца РНК-транскрипта, обозначаются как "последовательности выше по течению"; области последовательности в составе нити ДНК, имеющей ту же последовательность, что и РНК-транскрипт, расположенные в 3'-

области относительно 3'-конца РНК-транскрипта, обозначаются как "последовательности ниже по течению".

Термин "регуляторная последовательность" означает полинуклеотидную последовательность, которая может оказывать влияние на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми она лигирована. Природа таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В некоторых вариантах воплощения регуляторные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. Например, регуляторные последовательности для эукариот могут включать промоторы, содержащие один или несколько сайтов распознавания для транскрипционных факторов, последовательности энхансеров транскрипции и последовательность терминации транскрипции. "Регуляторные последовательности" могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнера по химерному белку.

Термин "вектор" означает любую молекулу или объект *(например,* нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), применяемые для переноса кодирующей белок информации в клетку-хозяина.

Термин "экспрессионный вектор" или "экспрессионная конструкция" означает вектор, который пригоден для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые определяют и/или управляют (во взаимодействии с клеткой-хозяином) экспрессией одной или нескольких гетерологичных кодирующих областей, присоединенных к ним функционально. Экспрессионная конструкция может включать, не ограничиваясь этим, последовательности, которые оказывают влияние или управляют транскрипцией, трансляцией и, если присутствуют интроны, воздействуют на сплайсинг РНК-кодирующей области, функционально к ним присоединенной.

При использовании в этом документе "функционально присоединенный" означает, что компоненты, к которым

применяется термин, находятся во взаимоотношениях, которые позволяют им выполнять присущие им функции в подходящих условиях. Например, регуляторная последовательность в векторе, которая "функционально присоединена" к кодирующей белок последовательности, лигирована с ней таким образом, что экспрессия кодирующей белок последовательности достигается в условиях, сопоставимых с транскрипционной активностью регуляторных последовательностей.

Термин "клетка-хозяин" означает клетку, которая была трансформирована или пригодна для трансформации последовательностью нуклеиновой кислоты и, посредством этого, экспрессирует представляющий интерес ген. Термин включает потомков родительской клетки, независимо от того, являются ли потомки идентичными по морфологии и генетической структуре исходной родительской клетке, при условии, что присутствует представляющий интерес ген.

Термин "трансдукция" означает перенос генов из одной бактерии в другую, обычно с помощью бактериофага. "Трансдукция" также означает захват и перенос принадлежащих эукариотическим клеткам последовательностей ретровирусами, дефектными по репликации.

Термин "трансфекция" означает поглощение чужеродной или экзогенной ДНК клеткой, и клетка является "трансфецированной", если экзогенная ДНК была внедрена внутрь объема клетки, отграниченного клеточной мембраной. Ряд методик трансфекции хорошо известны специалистам в данной области техники и раскрыты здесь. *См., например,* Graham *et al.,* (1973) *Virology* 52:456; Sambrook *et al.,* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *(см. выше);* Davis *et al.,* (1986) *Basic Methods in Molecular Biology,* Elsevier; Chu *et al.,* (1981) *Gene* 13:197. Такие методики могут применяться для внедрения одного или нескольких фрагментов экзогенной ДНК в пригодные клетки-хозяева.

Термин "трансформация" означает изменение генетических характеристик клетки, и клетка является трансформированной, если она была модифицирована таким образом, что содержит новую ДНК или РНК. Например, клетка является трансформированной в случае, когда она генетически модифицирована относительно ее нативного состояния путем внедрения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции или с помощью других методик. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки или может временно сохраняться в виде эписомального элемента без репликации, или может реплицироваться независимо, как плазмида. Считается, что клетка "стабильно трансформирована", если трансформирующая ДНК реплицируется при делении клетки.

Термины "полипептид" или "белок" используются здесь как взаимозаменяемые для обозначения полимера, состоящего из аминокислотных остатков. Термины также применимы к полимерам аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются аналогами или миметиками соответствующей аминокислоты природного происхождения, а также к полимерам аминокислот природного происхождения. Термины также могут включать полимеры аминокислот, которые были подвергнуты модификации, *например,* путем добавления углеводных остатков с образованием гликобелков или фосфорилирования. Полипептиды и белки могут продуцироваться природного происхождения и нерекомбинантной клеткой, или же полипептиды и белки могут продуцироваться созданной генно-инженерными способами или рекомбинантной клеткой. Полипептиды и белки могут содержать молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, вставки и/или замены одной или нескольких аминокислот в нативной последовательности. Термины "полипептид" и "белок" включают антиген-связывающие белки, которые специфично или избирательно связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или

FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, или включают последовательности, которые содержат делеции, вставки и/или замены одной или нескольких аминокислот антиген-связывающего белка, который специфично или избирательно связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Термин "полипептидный фрагмент" означает полипептид, который содержит амино-концевую делецию, карбокси-концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Такие фрагменты могут также содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В некоторых вариантах воплощения фрагменты имеют длину примерно от пяти до 500 аминокислот. Например, фрагменты могут иметь длину по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Полезные полипептидные фрагменты включают иммунологически функциональные фрагменты антител, содержащие домены для связывания. В случае антиген-связывающего белка, который связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, полезные фрагменты включают, не ограничиваясь этим, область CDR, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи, часть цепи антитела или только его вариабельную область, содержащую две области CDR, и т.п.

Термин "изолированный белок" означает, что рассматриваемый белок (1) свободен по меньшей мере от некоторых других белков, с которыми он находился бы в норме, (2) в существенной степени свободен от других белков из того же источника, *например,* из того же биологического вида, (3) экспрессируется клеткой, принадлежащей другому биологическому виду, (4) был отделен по меньшей мере от примерно 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он ассоциирован в природе, (5) функционально связан (посредством ковалентного

или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или (6) не встречается в природе. В типичном случае "изолированный белок" составляет по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 25% или по меньшей мере примерно 50% от данной пробы. Такой изолированный белок могут кодировать геномная ДНК, кДНК, мРНК или другая РНК синтетического происхождения, или любое их сочетание. Предпочтительно изолированный белок в существенной степени свободен от белков или полипептидов или других примесей, которые обнаруживаются в его природном окружении, которые препятствовали бы его применению в целях терапии, диагностики, профилактики, исследования или в иных целях.

"Вариант" полипептида *(например,* антиген-связывающий белок или антитело) содержит аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков вставлены, делетированы и/или заменены на аминокислотную последовательность, относящуюся к другой последовательности полипептида. Варианты включают химерные белки.

"Производное" полипептида – это полипептид *(например,* антиген-связывающий белок или антитело), который был химически модифицирован каким-либо способом, отличающимся от вариантов вставки, делеции или замены, *например,* с помощью конъюгации с другим химическим фрагментом.

Термин "природного происхождения" при использовании в этом описании изобретения в связи с биологическими материалами, такими как полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева и т.п., означает материалы, которые найдены в природе.

"Антиген-связывающая область" означает белок или часть белка, которые специфично связываются с определенным антигеном, *например,* FGFR1c, β-Клото или как с FGFR1c, так и с β-Клото. Например, та часть антиген-связывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном, и придает антиген-связывающему белку специфичность

и аффинность к антигену, называется "антиген-связывающей областью". Антиген-связывающая область в типичном случае включает одну или несколько "областей, определяющих комплементарность" ("CDR"). Некоторые антиген-связывающие области также включают одну или несколько "каркасных" областей. "CDR" – это аминокислотная последовательность, которая участвует в обеспечении специфичности и аффинности связывания антигена. "Каркасные" области могут способствовать поддержанию правильной конформации областей CDR для облегчения связывания между антиген-связывающей областью и антигеном.

В некоторых вариантах воплощения предложены рекомбинантные антиген-связывающие белки, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В данном контексте "рекомбинантный белок" – это белок, полученный с применением рекомбинантных методик, *т.е.* посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано здесь. Способы и методики получения рекомбинантных белков хорошо известны специалистам в данной области техники.

Термин "конкурировать" при использовании в контексте антиген-связывающих белков *(например,* нейтрализующих антиген-связывающих белков, нейтрализующих антител, агонистических антиген-связывающих белков, агонистических антител и связывающих белков, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4), которые конкурируют за один и тот же эпитоп или сайт связывания на мишени, означает конкуренцию между антиген-связывающими белками, которая определяется с помощью анализа, при котором исследуемый антиген-связывающий белок *(например,* антитело или иммунологически функциональный его фрагмент) предотвращает или ингибирует специфичное связывание референсной молекулы *(например,* референсного лиганда или референсного антиген-связывающего белка, такого как

референсное антитело) с общим антигеном *(например,* FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4, β-Клото или их фрагментом). Для определения того, конкурирует ли исследуемая молекула с референсной молекулой за связывание, могут быть применены различные типы анализа конкурентного связывания. Примеры типов анализа, которые могут применяться, включают твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), сэндвич-вариант конкурентного анализа *(см., например,* Stahli *et al.*, (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой ИФА с биотином-авидином *(см., например,* Kirkland *et al.*, (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный анализ с прямым маркированием, сэндвич-вариант твердофазного анализа с прямым маркированием *(см., например,* Harlow and Lane, (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Press); твердофазный РИА с прямым маркированием с применением маркера I-125 *(см, например,* Morel *et al.*, (1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой ИФА с биотином-авидином *(см., например,* Cheung, *et al.*, (1990) *Virology* 176:546-552); и РИА с прямым маркированием (Moldenhauer *et al.*, (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). В типичном случае такой анализ включает применение очищенного антигена, иммобилизованного на твердой подложке, или клеток, несущих либо немаркированный исследуемый антиген-связывающий белок, либо меченый референсный антиген-связывающий белок. Конкурентное ингибирование измеряют, определяя количество маркера, связавшегося с твердой подложкой или клетками, в присутствии исследуемого антиген-связывающего белка. Обычно исследуемый антиген-связывающий белок присутствует в избытке. Антиген-связывающие белки, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурентные антиген-связывающие белки), включают антиген-связывающие белки, которые связываются с тем же эпитопом, что и референсные антиген-связывающие белки, и включают антиген-связывающие белки, которые связываются с эпитопом,

расположенным рядом, достаточно близко к эпитопу, с которым связывается референсный антиген-связывающий белок, для того, чтобы возникло стерическое препятствие. Дополнительное подробное описание способов определения конкурентного связывания приведено здесь в примерах. В типичном случае, когда конкурирующий антиген-связывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать специфичное связывание референсного антиген-связывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 97%, или более.

Термин "антиген" означает молекулу или часть молекулы, которые могут быть связаны агентом селективного связывания, таким как антиген-связывающий белок (включая, *например,* антитело или его иммунологически функциональный фрагмент), а также могут быть применены для введения животному с целью продукции антител, способных связываться с этим антигеном. Антиген может содержать один или несколько эпитопов, способных взаимодействовать с различными антиген-связывающими белками, *например,* антителами.

Термин "эпитоп" означает аминокислоты целевой молекулы, с которыми взаимодействует антиген-связывающий белок (например, антитело) при связывании антиген-связывающего белка с целевой молекулой. Термин включает любое подмножество из полного списка аминокислот целевой молекулы, с которым происходит контакт при связывании антиген-связывающего белка, такого как антитело, с целевой молекулой. Эпитоп может быть непрерывным или прерывистым *(например,* (i) в одноцепочечном полипептиде – аминокислотные остатки, которые не расположены подряд в полипептидной последовательности, но которые в контексте целевой молекулы связываются с антиген-связывающим белком, или (ii) в мультимерном рецепторе, содержащем два или несколько индивидуальных компонента, *например,* (i) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, и (ii) β-Клото, – аминокислотные остатки,

которые находятся на одном или нескольких индивидуальных компонентах, но которые при этом связываются с антиген-связывающим белком). В некоторых вариантах воплощения эпитопы могут являться миметиками в том смысле, что они имеют пространственную структуру, которая схожа с антигенным эпитопом, использованным для получения антиген-связывающего белка, но, тем не менее, не содержат или содержат лишь некоторые из аминокислотных остатков, обнаруживаемых в этом эпитопе, использованном для получения антиген-связывающего белка. Наиболее часто эпитопы расположены на белке, но в некоторых случаях могут располагаться на молекулах других типов, таких как нуклеиновые кислоты. Детерминанты эпитопа могут включать химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфичные пространственные структурные характеристики и/или специфичные характеристика зарядов. В общем случае антиген-связывающие белки, специфичные к конкретной целевой молекуле, предпочтительно будут распознавать эпитоп на целевой молекуле в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Термин "идентичность" означает соотношение между последовательностями двух или более молекул полипептидов или двух или более молекул нуклеиновых кислот, определенное с помощью выравнивания и сравнения этих последовательностей. "Процент идентичности" означает процентное отношение идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и вычисляется на основании размера самой маленькой из сравниваемых молекул. При таких вычислениях пропуски в выравниваниях (если они имеются) должны вноситься с применением определенной математической модели или компьютерной программы (*т.е.*, "алгоритма"). Способы, которые могут применяться для вычисления идентичности выровненных нуклеиновых кислот или полипептидов, включают способы, описанные в публикациях *Computational Molecular Biology*,

(Lesk, A. M., ed.), (1988) New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., (1987) Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo *et al.*, (1988) *SIAM J. Applied Math.* 48:1073.

При вычислении процента идентичности сравниваемые последовательности выравнивают таким способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Компьютерная программа, которую применяют для определения процента идентичности, – это пакет программ GCG, который содержит GAP (Devereux *et al.*, (1984) *Nucl. Acid Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). Компьютерный алгоритм GAP применяют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для достижения оптимального совпадения, соответственно, их аминокислот или нуклеотидов ("подогнанного перекрывания", согласно определению в соответствии с алгоритмом). Совместно с алгоритмом используют штраф за внесение пропуска (который вычисляется как трехкратное среднее значение по диагонали, где "среднее значение по диагонали" – это среднее значение по диагонали в используемой матрице сравнения; "диагональ" – это оценка или число, присвоенное каждому полному совпадению аминокислот конкретной матрицей сравнения) и штраф за продление пропуска (который обычно равен 1/10 от штрафа за внесение пропуска), а также матрицу сравнения, такую как PAM250 или BLOSUM62. В некоторых вариантах воплощения в алгоритме применяется также стандартная матрица сравнения *(см.*, Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:345-352 для

информации о матрице сравнения PAM 250; Henikoff *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915-10919 для информации о матрице сравнения BLOSUM 62).

Рекомендованные параметры для определения процента идентичности для полипептидов или нуклеотидных последовательностей с применением программы GAP следующие:

Алгоритм: Needleman *et al.*, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453;

Матрица сравнения: BLOSUM 62 из работы Henikoff *et al.*, 1992, *(см. выше);*

Штраф за пропуск: 12 (но без штрафа за пропуски на концах)

Штраф за длину пропуска: 4

Пороговое значение сходства: 0

Некоторые схемы для выравнивания двух аминокислотных последовательностей могут приводить к совмещению только очень короткой области двух последовательностей, и эта маленькая выровненная область может обладать высокой идентичностью последовательностей, даже если между двумя полноразмерными последовательностями нет существенной взаимосвязи. Соответственно, выбранный способ выравнивания *(например,* программа GAP) может быть скорректирован, если это необходимо, для получения в результате выравнивания, которое перекрывает по меньшей мере 50 идущих подряд аминокислот целевого полипептида.

При использовании в этом документе "в существенной степени чистый" означает, что описываемый вид молекулы является преимущественным присутствующим видом, т.е. на молярном уровне он более многочисленен, чем любой другой индивидуальный вид молекулы в той же смеси. В некоторых вариантах воплощения в существенной степени чистая молекула – это композиция, в которой целевой вид молекулы составляет по меньшей мере 50% (на молярном уровне) от всех присутствующих видов макромолекул. В других вариантах воплощения в существенной степени чистая композиция будет составлять по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% от всех видов макромолекул,

присутствующих в композиции. В других вариантах воплощения целевой вид молекулы очищен до существенной гомогенности, при этом примесные виды молекул не могут быть обнаружены в композиции стандартными способами детекции, и, таким образом, композиция состоит из единственного детектируемого вида макромолекул.

Термины "лечить" и "лечение" относятся к признакам успешного лечения или уменьшения интенсивности симптомов повреждения, патологии или состояния, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как уменьшение боли или выраженности симптома; ремиссия; ослабление симптомов или перевод повреждения, патологии или состояния в более переносимое для пациента состояние; замедление скорости дегенерации или ухудшения; превращение конечной точки дегенерации в менее изнуряющую; улучшение физического и ментального благополучия пациента. Лечение или уменьшение интенсивности симптомов может быть основано на объективных или субъективных параметрах, включая результаты физикального обследования, нейропсихиатрической проверки и/или психиатрической оценки. Например, некоторые способы, представленные здесь, можно применять для лечения диабета 2 типа, ожирения и/или дислипидемии как в виде профилактики, так и в виде неотложного лечения для снижения уровней глюкозы в плазме, снижения уровней циркулирующих триглицеридов, снижения уровней циркулирующего холестерина и/или уменьшения интенсивности симптома, связанного с диабетом 2 типа, ожирением и дислипидемией.

"Эффективное количество" – это в общем случае количество, достаточное для снижения тяжести и/или частоты проявления симптомов, избавления от симптомов и/или лежащей в их основе причины, предотвращения возникновения симптомов и/или лежащей в их основе причины и/или улучшения состояния или восстановления повреждения, возникшего в результате диабета, ожирения или дислипидемии, или связанного с ними повреждения.

В некоторых вариантах воплощения эффективное количество – это терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. "Терапевтически эффективное количество" – это количество, достаточное для того, чтобы вылечить болезненное состояние *(например,* диабет, ожирение или дислипидемию) или симптомы, в частности, состояние или симптом, связанные с болезненным состоянием, или иным способом предотвратить, препятствовать, замедлить или обратить прогрессирование болезненного состояния или любого нежелательного симптома, связанного с заболеванием каким-либо образом. "Профилактически эффективное количество" – это количество фармацевтической композиции, которое при введении субъекту будет оказывать требуемое профилактическое воздействие, *например,* предотвращая или отсрочивая возникновение (или повторное возникновение) диабета, ожирения или дислипидемии, или снижая вероятность возникновения (или повторного возникновения) диабета, ожирения или дислипидемии, или связанных с ними симптомов. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникает при введении одной дозы, а может возникать только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество может быть введено за одно или более введений.

Термин "аминокислота" имеет стандартное значение, принятое в данной области техники. Двадцать аминокислот природного происхождения и их аббревиатуры используются стандартно. *См.* Immunology-A Synthesis, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991), содержание которой включено сюда в качестве ссылки. Стереоизомеры *(например,* D-аминокислоты) двадцати канонических аминокислот, искусственно созданные и неприродного происхождения аминокислоты, такие как α-,α-дизамещенные аминокислоты, N-алкилированные аминокислоты и другие неканонические аминокислоты, также могут являться пригодными компонентами для полипептидов и включены в понятие

"аминокислота". Примеры аминокислот неприродного происхождения (которые могут заменять собой любые аминокислоты природного происхождения, обнаруженные в любой последовательности, раскрытой здесь, при необходимости) включают: 4-гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат, ε-N,N,N-триметиллизин, ε-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ-N-метиларгинин и другие схожие аминокислоты и иминокислоты *(например,* 4-гидроксипролин). При изображении полипептидов в этом документе слева расположен амино-конец, а справа – карбокси-конец, в соответствии с общепринятыми правилами обозначения. Неограничивающие списки примеров аминокислот неприродного происхождения, которые могут быть вставлены в последовательность антиген-связывающего белка или замещать остатки дикого типа в последовательности антиген-связывающего белка, включают β-аминокислоты, гомоаминокислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты, содержащие производные боковых цепей. Примеры включают (в L-форме или в D-форме; с аббревиатурами, как указано в скобках) следующие соединения: цитруллин (Cit), гомоцитруллин (hCit), Nα-метилцитруллин (NMeCit), Nα-метилгомоцитруллин (Nα-MeHoCit), орнитин (Orn), Nα-метилорнитин (Nα-MeOrn или NMeOrn), саркозин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hQ), Nα-метиларгинин (NMeR), Nα-метиллейцин (Nα-MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), Nα-метилглутамин (NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновая кислота (Oic), 3-(1-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (IgI), пара-йодофенилаланин (pI-Phe), пара-аминофенилаланин (4AmP или 4-amino-Phe), 4-гуанидинофенилаланин (Guf), глициллизин (сокращенное название "K(Nε-глицил)" или "K(глицил)", или "K(gly)"), нитрофенилаланин (nitrophe), аминофенилаланин (aminophe или Amino-Phe), бензилфенилаланин

(benzylphe), γ-карбоксиглутаминовая кислота (γ-carboxyglu), гидроксипролин (hydroxypro), p-карбоксил-фенилаланин (Cpa), α-аминоадипиновая кислота (Aad), Nα-метил валин (NMeVal), N-α-метиллейцин (NMeLeu), Nα-метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклоцексилглицин (Chg), ацетиларгинин (acetylarg), α,β-диаминопропионовая кислота (Dpr), α,γ-диаминомасляная кислота (Dab), диаминопропионовая кислота (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метилфенилаланин (MePhe), β,β-дифенилаланин (BiPhA), аминомасляная кислота (Abu), 4-фенил-фенилаланин (или бифенилаланин; 4Bip), α-аминоизомасляная кислота (Aib), бета-аланин, бета-аминопропионовая кислота, пиперидиновая кислота, аминокапроновая кислота, аминогептановая кислота, аминопимелиновая кислота, десмозин, диаминопимелиновая кислота, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксилизин, алло-гидроксилизин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-метилвалин, 4-гидроксипролин (Hyp), γ-карбоксиглутамат, ε-N,N,N-триметиллизин, ε-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, ω-метиларгинин, 4-амино-O-фталевая кислота (4APA) и другие схожие аминокислоты и производные формы любых из специально перечисленных молекул.

II. ОБЩИЙ ОБЗОР

В этом документе предложены антиген-связывающие белки, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4: Уникальной особенностью антиген-связывающих белков, раскрытых здесь, является агонистическая природа этих белков, в частности, способность имитировать эффект *in vivo* фактора FGF21 и индуцировать FGF21-подобный сигналлинг. Более конкретно и специфично - некоторые из антиген-связывающих белков, раскрытых здесь, индуцируют FGF21-подобный сигналлинг в

нескольких системах для проведения анализа *in vitro* с применением клеток, включая ELK-люциферазный репортерный анализ из примера 5 в следующих условиях: (1) связывание с рецептором для FGF21 и его активность зависят от β-Клото; (2) активность избирательна в отношении комплекса FGFR1c/β-Клото; (3) связывание с FGFR1c/β-Клото активизирует пути FGF21-подобного сигналлинга; и (4) эффективность (EC50) сопоставима со стандартом FGF21 дикого типа, содержащим зрелую форму SEQ ID №: 2, согласно измерениям в ходе следующих типов клеточного анализа: (1) люциферазного репортерного анализа клеток, опосредуемого рекомбинантным рецептором для FGF21, из примера 5; (2) анализа клеток по опосредуемому рекомбинантным рецептором для FGF21 фосфорилированию ERK из примера 5; и (3) анализа фосфорилирования ERK в адипоцитах человека, как описано более подробно в примере 7. Следовательно, ожидается, что раскрытые антиген-связывающие белки будут демонстрировать активности *in vivo*, которые соответствуют природной биологической функции фактора FGF21. Эта особенность делает раскрытые антиген-связывающие белки терапевтическими средствами, пригодными для лечения болезней обмена веществ, таких как диабет 2 типа, ожирение, дислипидемия, НАСГ, сердечно-сосудистое заболевание, метаболический синдром и, в широком смысле, любого заболевания или состояния, при котором требуется имитировать или усиливать эффекты *in vivo* фактора FGF21.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения предложенные антиген-связывающие белки могут содержать полипептиды, в которые могут быть внедрены и/или присоединены одна или более областей, определяющих комплементарность (CDR). В таких антиген-связывающих белках области CDR могут быть внедрены в "каркасную" область, которая ориентирует область(и) CDR таким образом, чтобы достигались необходимые антиген-связывающие свойства области(ей) CDR. В целом такие предложенные антиген-связывающие белки могут облегчать или

усиливать взаимодействие между FGFR1c и β-Клото и могут в существенной степени индуцировать FGF21-подобный сигналлинг.

Некоторые антиген-связывающие белки, описанные здесь, являются антителами или происходят от антител. В некоторых вариантах воплощения полипептидная структура антиген-связывающих белков основана на антителах, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, биспецифичные антитела, мини-антитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые здесь "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, антитела со сшивками (иногда называемые в этом документе "конъюгатами антител"), полуантитела и их фрагменты. Различные структуры дополнительно описаны здесь ниже.

Показано, что предложенные здесь антиген-связывающие белки связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и, в частности, с (i) β-Клото человека; (ii) FGFR1c человека, FGFR2c человека, FGFR3c человека или FGFR4 человека; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото человека и одну из молекул FGFR1c человека, FGFR2c человека, FGFR3c человека и FGFR4 человека. Как описано и показано в Примерах, представленных здесь, согласно результатам вестерн-блота, имеющиеся в продаже антитела против β-Клото или против FGFR1c связываются с денатурированными β-Клото или FGFR1c, тогда как антиген-связывающие белки (агонистические антитела) не связываются. И наоборот, предложенные антиген-связывающие белки распознают нативную структуру FGFR1c и β-Клото на поверхности клетки, тогда как имеющиеся в продаже антитела – нет, согласно приведенным результатам анализа FACS. См. Пример 9. Следовательно, предложенные антиген-связывающие белки имитируют природную биологическую активность *in vivo* фактора FGF21. Вследствие этого предложенные здесь антиген-связывающие белки способны индуцировать активность, характерную для FGF21-подобного

сигналлинга. В частности, раскрытые антиген-связывающие белки могут обладать одной или несколькими из следующих активностей *in vivo:* индукция FGF21-подобных путей передачи сигнала, снижение уровней глюкозы в крови, снижение уровней циркулирующих липидов, улучшение метаболических параметров и другие физиологические эффекты, индуцируемые *in vivo* в результате образования тройного комплекса FGFR1c, β-Клото и FGF21, например, при таких состояниях как диабет 2 типа, ожирение, дислипидемия, НАСГ, сердечно-сосудистое заболевание и метаболический синдром.

Раскрытые здесь антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, обладают различными полезными особенностями. Некоторые из антиген-связывающих белков, например, полезны для проведения анализа специфичного связывания, для аффинной очистки (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, включая принадлежащие человеку формы этих раскрытых белков, а также для скринингового исследования с целью выявления других агонистов активности, связанной с FGF21-подобным сигналлингом.

Раскрытые здесь антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, могут применяться при различных способах лечения, как объясняется здесь. Например, некоторые антиген-связывающие белки полезны для лечения состояний, связанных с процессами FGF21-подобного сигналлинга у пациентов, например, для уменьшения тяжести, смягчения течения или лечения диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии, НАСГ, сердечно-сосудистого заболевания и метаболического синдрома. Другие применения антиген-связывающих белков включают, например, диагностику заболеваний или состояний,

связанных с β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4 или FGF21, и скрининговые исследования с целью определения присутствия или отсутствия этих молекул. Некоторые из антиген-связывающих белков, описанных здесь, могут быть полезны при лечении состояний, симптомов и/или патологии, ассоциированных с пониженной активностью, связанной с FGF21-подобным сигналлингом. Примеры состояний включают, не ограничиваясь этим, диабет, ожирение, НАСГ и дислипидемию.

FGF21

Антиген-связывающие белки, раскрытые здесь, индуцируют FGF21-опосредуемый сигналлинг, как указано в этом документе. В системе *in vivo* зрелая форма FGF21 является активной формой этой молекулы. Приведена нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерный FGF21; подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие сигнальную последовательность.

ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT
TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC
ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG
CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC
CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG
AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT
ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG
CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC
TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC
CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG
TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG
CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CCC CCG GAG CCA CCC GGA ATC
CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC
ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
(SEQ ID №: 1).

Приведена аминокислотная последовательность полноразмерного FGF21, подчеркнуты аминокислоты, составляющие сигнальную последовательность:

M D S D E T G F E H S G L W V S V L A G L L L G A C Q A H P I
P D S S P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E A H L E
I R E D G T V G G A A D Q S P E S L L Q L K A L K P G V I Q I
L G V K T S R F L C Q R P D G A L Y G S L H F D P E A C S F R
E L L L E D G Y N V Y Q S E A H G L P L H L P G N K S P H R D
P A P R G P A R F L P L P G L P P A P P E P P G I L A P Q P P
D V G S S D P L S M V G P S Q G R S P S Y A S (SEQ ID №: 2).

FGFR1c

Антиген-связывающие белки, раскрытые здесь, связываются с FGFR1c, в частности, с FGFR1c человека, находящимся в ассоциации с β-Клото. Приведена нуклеотидная последовательность, кодирующая FGFR1c человека (номер доступа в GenBank NM_023110):

ATGTGGAGCTGGAAGTGCCTCCTCTTCTGGGCTGTGCTGGTCACAGCCACAC
TCTGCACCGCTAGGCCGTCCCCGACCTTGCCTGAACAAGCCCAGCCCTGGGG
AGCCCCTGTGGAAGTGGAGTCCTTCCTGGTCCACCCCGGTGACCTGCTGCAG
CTTCGCTGTCGGCTGCGGGACGATGTGCAGAGCATCAACTGGCTGCGGGACG
GGGTGCAGCTGGCGGAAAGCAACCGCACCCGCATCACAGGGGAGGAGGTGGA
GGTGCAGGACTCCGTGCCCGCAGACTCCGGCCTCTATGCTTGCGTAACCAGC
AGCCCCTCGGGCAGTGACACCACCTACTTCTCCGTCAATGTTTCAGATGCTC
TCCCCTCCTCGGAGGATGATGATGATGATGATGACTCCTCTTCAGAGGAGAA
AGAAACAGATAACACCAAACCAAACCGTATGCCCGTAGCTCCATATTGGACA
TCACCAGAAAAGATGGAAAAGAAATTGCATGCAGTGCCGGCTGCCAAGACAG
TGAAGTTCAAATGCCCTTCCAGTGGGACACCAAACCCAACACTGCGCTGGTT
GAAAAATGGCAAAGAATTCAAACCTGACCACAGAATTGGAGGCTACAAGGTC
CGTTATGCCACCTGGAGCATCATAATGGACTCTGTGGTGCCCTCTGACAAGG
GCAACTACACCTGCATTGTGGAGAATGAGTACGGCAGCATCAACCACACATA
CCAGCTGGATGTCGTGGAGCGGTCCCCTCACCGGCCCATCCTGCAAGCAGGG
TTGCCCGCCAACAAAACAGTGGCCCTGGGTAGCAACGTGGAGTTCATGTGTA
AGGTGTACAGTGACCCGCAGCCGCACATCCAGTGGCTAAAGCACATCGAGGT
GAATGGGAGCAAGATTGGCCCAGACAACCTGCCTTATGTCCAGATCTTGAAG
ACTGCTGGAGTTAATACCACCGACAAAGAGATGGAGGTGCTTCACTTAAGAA
ATGTCTCCTTTGAGGACGCAGGGGAGTATACGTGCTTGGCGGGTAACTCTAT

CGGACTCTCCCATCACTCTGCATGGTTGACCGTTCTGGAAGCCCTGGAAGAG
AGGCCGGCAGTGATGACCTCGCCCCTGTACCTGGAGATCATCATCTATTGCA
CAGGGGCCTTCCTCATCTCCTGCATGGTGGGGTCGGTCATCGTCTACAAGAT
GAAGAGTGGTACCAAGAAGAGTGACTTCCACAGCCAGATGGCTGTGCACAAG
CTGGCCAAGAGCATCCCTCTGCGCAGACAGGTAACAGTGTCTGCTGACTCCA
GTGCATCCATGAACTCTGGGGTTCTTCTGGTTCGGCCATCACGGCTCTCCTC
CAGTGGGACTCCCATGCTAGCAGGGGTCTCTGAGTATGAGCTTCCCGAAGAC
CCTCGCTGGGAGCTGCCTCGGGACAGACTGGTCTTAGGCAAACCCCTGGGAG
AGGGCTGCTTTGGGCAGGTGGTGTTGGCAGAGGCTATCGGGCTGGACAAGGA
CAAACCCAACCGTGTGACCAAAGTGGCTGTGAAGATGTTGAAGTCGGACGCA
ACAGAGAAAGACTTGTCAGACCTGATCTCAGAAATGGAGATGATGAAGATGA
TCGGGAAGCATAAGAATATCATCAACCTGCTGGGGGCCTGCACGCAGGATGG
TCCCTTGTATGTCATCGTGGAGTATGCCTCCAAGGGCAACCTGCGGGAGTAC
CTGCAGGCCCGGAGGCCCCCAGGGCTGGAATACTGCTACAACCCCAGCCACA
ACCCAGAGGAGCAGCTCTCCTCCAAGGACCTGGTGTCCTGCGCCTACCAGGT
GGCCCGAGGCATGGAGTATCTGGCCTCCAAGAAGTGCATACACCGAGACCTG
GCAGCCAGGAATGTCCTGGTGACAGAGGACAATGTGATGAAGATAGCAGACT
TTGGCCTCGCACGGGACATTCACCACATCGACTACTATAAAAAGACAACCAA
CGGCCGACTGCCTGTGAAGTGGATGGCACCCGAGGCATTATTTGACCGGATC
TACACCCACCAGAGTGATGTGTGGTCTTTCGGGGTGCTCCTGTGGGAGATCT
TCACTCTGGGCGGCTCCCCATACCCCGGTGTGCCTGTGGAGGAACTTTTCAA
GCTGCTGAAGGAGGGTCACCGCATGGACAAGCCCAGTAACTGCACCAACGAG
CTGTACATGATGATGCGGGACTGCTGGCATGCAGTGCCCTCACAGAGACCCA
CCTTCAAGCAGCTGGTGGAAGACCTGGACCGCATCGTGGCCTTGACCTCCAA
CCAGGAGTACCTGGACCTGTCCATGCCCCTGGACCAGTACTCCCCCAGCTTT
CCCGACACCCGGAGCTCTACGTGCTCCTCAGGGGAGGATTCCGTCTTCTCTC
ATGAGCCGCTGCCCGAGGAGCCCTGCCTGCCCCGACACCCAGCCCAGCTTGC
CAATGGCGGACTCAAACGCCGCTGA (SEQ ID №:3).

Приведена аминокислотная последовательность FGFR1c человека (номер доступа в GenBank NP_075598):

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLLQ
LRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTS
SPSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMPVAPYWT

SPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKV
RYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQAG
LPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQILK
TAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEE
RPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSDFHSQMAVHK
LAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYELPED
PRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDA
TEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREY
LQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLSSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDL
AARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHHIDYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRI
YTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNE
LYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSF
PDTRSSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR (SEQ ID
№: 4).

Антиген-связывающие белки, описанные здесь, связываются с внеклеточной частью молекулы FGFR1c. Примером внеклеточной области FGFR1c служит:

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLLQLRCRL
RDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYF
SVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAA
KTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNY
TCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQP
HIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCL
AGNSIGLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLY (SEQ ID №: 5).

Как описано здесь, белки FGFR1c также могут включать фрагменты. При использовании в этом документе эти термины употребляются как взаимозаменяемые для обозначения рецептора, в частности и если не указано иначе, рецептора человека, который при ассоциации с β-Клото и FGF21 индуцирует активность, связанную с FGF21-подобным сигналлингом.

Термин FGFR1c также включает пост-трансляционные модификации аминокислотной последовательности FGFR1c, например, возможные сайты N-гликозилирования. Таким образом, антиген-связывающие

белки могут связываться с белками или быть получены из белков, гликозилированных по одному или нескольким положениям.

β-Клото

Антиген-связывающие белки, раскрытые здесь, связываются с β-Клото, в частности, с β-Клото человека. Приведена нуклеотидная последовательность, кодирующая β-Клото человека (номер доступа в GenBank NM_175737):

ATGAAGCCAGGCTGTGCGGCAGGATCTCCAGGGAATGAATGGATTTTCTTCAG
CACTGATGAAATAACCACACGCTATAGGAATACAATGTCCAACGGGGGATTGC
AAAGATCTGTCATCCTGTCAGCACTTATTCTGCTACGAGCTGTTACTGGATTC
TCTGGAGATGGAAGAGCTATATGGTCTAAAAATCCTAATTTTACTCCGGTAAA
TGAAAGTCAGCTGTTTCTCTATGACACTTTCCCTAAAAACTTTTTCTGGGGTA
TTGGGACTGGAGCATTGCAAGTGGAAGGGAGTTGGAAGAAGGATGGAAAAGGA
CCTTCTATATGGGATCATTTCATCCACACACACCTTAAAAATGTCAGCAGCAC
GAATGGTTCCAGTGACAGTTATATTTTTCTGGAAAAAGACTTATCAGCCCTGG
ATTTTATAGGAGTTTCTTTTTATCAATTTTCAATTTCCTGGCCAAGGCTTTTC
CCCGATGGAATAGTAACAGTTGCCAACGCAAAAGGTCTGCAGTACTACAGTAC
TCTTCTGGACGCTCTAGTGCTTAGAAACATTGAACCTATAGTTACTTTATACC
ACTGGGATTTGCCTTTGGCACTACAAGAAAAATATGGGGGGTGGAAAAATGAT
ACCATAATAGATATCTTCAATGACTATGCCACATACTGTTTCCAGATGTTTGG
GGACCGTGTCAAATATTGGATTACAATTCACAACCCATATCTAGTGGCTTGGC
ATGGGTATGGGACAGGTATGCATGCCCCTGGAGAGAAGGGAAATTTAGCAGCT
GTCTACACTGTGGGACACAACTTGATCAAGGCTCACTCGAAAGTTTGGCATAA
CTACAACACACATTTCCGCCCACATCAGAAGGGTTGGTTATCGATCACGTTGG
GATCTCATTGGATCGAGCCAAACCGGTCGGAAAACACGATGGATATATTCAAA
TGTCAACAATCCATGGTTTCTGTGCTTGGATGGTTTGCCAACCCTATCCATGG
GGATGGCGACTATCCAGAGGGGATGAGAAAGAAGTTGTTCTCCGTTCTACCCA
TTTTCTCTGAAGCAGAGAAGCATGAGATGAGAGGCACAGCTGATTTCTTTGCC
TTTTCTTTTGGACCCAACAACTTCAAGCCCCTAAACACCATGGCTAAAATGGG
ACAAAATGTTTCACTTAATTTAAGAGAAGCGCTGAACTGGATTAAACTGGAAT
ACAACAACCCTCGAATCTTGATTGCTGAGAATGGCTGGTTCACAGACAGTCGT
GTGAAAACAGAAGACACCACGGCCATCTACATGATGAAGAATTTCCTCAGCCA
GGTGCTTCAAGCAATAAGGTTAGATGAAATACGAGTGTTTGGTTATACTGCCT

GGTCTCTCCTGGATGGCTTTGAATGGCAGGATGCTTACACCATCCGCCGAGGA
TTATTTTATGTGGATTTTAACAGTAAACAGAAAGAGCGGAAACCTAAGTCTTC
AGCACACTACTACAAACAGATCATACGAGAAAATGGTTTTTCTTTAAAAGAGT
CCACGCCAGATGTGCAGGGCCAGTTTCCCTGTGACTTCTCCTGGGGTGTCACT
GAATCTGTTCTTAAGCCCGAGTCTGTGGCTTCGTCCCCACAGTTCAGCGATCC
TCATCTGTACGTGTGGAACGCCACTGGCAACAGACTGTTGCACCGAGTGGAAG
GGGTGAGGCTGAAAACACGACCCGCTCAATGCACAGATTTTGTAAACATCAAA
AAACAACTTGAGATGTTGGCAAGAATGAAAGTCACCCACTACCGGTTTGCTCT
GGATTGGGCCTCGGTCCTTCCCACTGGCAACCTGTCCGCGGTGAACCGACAGG
CCCTGAGGTACTACAGGTGCGTGGTCAGTGAGGGGCTGAAGCTTGGCATCTCC
GCGATGGTCACCCTGTATTATCCGACCCACGCCCACCTAGGCCTCCCCGAGCC
TCTGTTGCATGCCGACGGGTGGCTGAACCCATCGACGGCCGAGGCCTTCCAGG
CCTACGCTGGGCTGTGCTTCCAGGAGCTGGGGGACCTGGTGAAGCTCTGGATC
ACCATCAACGAGCCTAACCGGCTAAGTGACATCTACAACCGCTCTGGCAACGA
CACCTACGGGGCGGCGCACAACCTGCTGGTGGCCCACGCCCTGGCCTGGCGCC
TCTACGACCGGCAGTTCAGGCCCTCACAGCGCGGGGCCGTGTCGCTGTCGCTG
CACGCGGACTGGGCGGAACCCGCCAACCCCTATGCTGACTCGCACTGGAGGGC
GGCCGAGCGCTTCCTGCAGTTCGAGATCGCCTGGTTCGCCGAGCCGCTCTTCA
AGACCGGGGACTACCCCGCGGCCATGAGGGAATACATTGCCTCCAAGCACCGA
CGGGGGCTTTCCAGCTCGGCCCTGCCGCGCCTCACCGAGGCCGAAAGGAGGCT
GCTCAAGGGCACGGTCGACTTCTGCGCGCTCAACCACTTCACCACTAGGTTCG
TGATGCACGAGCAGCTGGCCGGCAGCCGCTACGACTCGGACAGGGACATCCAG
TTTCTGCAGGACATCACCCGCCTGAGCTCCCCCACGCGCCTGGCTGTGATTCC
CTGGGGGGTGCGCAAGCTGCTGCGGTGGGTCCGGAGGAACTACGGCGACATGG
ACATTTACATCACCGCCAGTGGCATCGACGACCAGGCTCTGGAGGATGACCGG
CTCCGGAAGTACTACCTAGGGAAGTACCTTCAGGAGGTGCTGAAAGCATACCT
GATTGATAAAGTCAGAATCAAAGGCTATTATGCATTCAAACTGGCTGAAGAGA
AATCTAAACCCAGATTTGGATTCTTCACATCTGATTTTAAAGCTAAATCCTCA
ATACAATTTTACAACAAAGTGATCAGCAGCAGGGGCTTCCCTTTTGAGAACAG
TAGTTCTAGATGCAGTCAGACCCAAGAAAATACAGAGTGCACTGTCTGCTTAT
TCCTTGTGCAGAAGAAACCACTGATATTCCTGGGTTGTTGCTTCTTCTCCACC
CTGGTTCTACTCTTATCAATTGCCATTTTTCAAAGGCAGAAGAGAAGAAAGTT
TTGGAAAGCAAAAAACTTACAACACATACCATTAAAGAAAGGCAAGAGAGTTG
TTAGCTAA (SEQ ID №: 6).

Приведена аминокислотная последовательность полноразмерного β-Клото человека (номер доступа в GenBank NP_783864):

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTG
FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDG
KGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWP
RLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGG
WKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEK
GNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSEN
TMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMR
GTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREALNWIKLEYNNPRILIAE
NGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEW
QDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGQ
FPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTR
PAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYR
CVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGL
CFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDR
QFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTG
DYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVM
HEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMD
IYITASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEE
KSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVC
LFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGK
RVVS (SEQ ID №: 7).

Антиген-связывающие белки, описанные здесь, связываются с внеклеточной частью молекулы β-Клото. Примером внеклеточной областью β-Клото служит:

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTGFSGDG
RAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFI
HTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKG
LQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQM
FGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYN
THFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPE
GMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREA

LNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFG
YTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKES
TPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLK
TRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVV
SEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDL
VKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLS
LHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGL
SSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITR
LSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQ
EVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPF
ENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKP
(SEQ ID №: 8).

Форма β-Клото мыши и ее фрагменты и подпоследовательности могут применяться при изучении и/или конструировании молекул, приведенных здесь. Приведена нуклеотидная последовательность, кодирующая β-Клото мыши (номер доступа в GenBank NM_031180):

ATGAAGACAGGCTGTGCAGCAGGGTCTCCGGGGAATGAATGGATTTTCTTCAGCTCT
GATGAAAGAAACACACGCTCTAGGAAAACAATGTCCAACAGGGCACTGCAAAGATCT
GCCGTGCTGTCTGCGTTTGTTCTGCTGCGAGCTGTTACCGGCTTCTCCGGAGACGGG
AAAGCAATATGGGATAAAAAACAGTACGTGAGTCCGGTAAACCCAAGTCAGCTGTTC
CTCTATGACACTTTCCCTAAAAACTTTTCCTGGGGCGTTGGGACCGGAGCATTTCAA
GTGGAAGGGAGTTGGAAGACAGATGGAAGAGGACCCTCGATCTGGGATCGGTACGTC
TACTCACACCTGAGAGGTGTCAACGGCACAGACAGATCCACTGACAGTTACATCTTT
CTGGAAAAAGACTTGTTGGCTCTGGATTTTTTAGGAGTTTCTTTTTATCAGTTCTCA
ATCTCCTGGCCACGGTTGTTTCCCAATGGAACAGTAGCAGCAGTGAATGCGCAAGGT
CTCCGGTACTACCGTGCACTTCTGGACTCGCTGGTACTTAGGAATATCGAGCCCATT
GTTACCTTGTACCATTGGGATTTGCCTCTGACGCTCCAGGAAGAATATGGGGGCTGG
AAAAATGCAACTATGATAGATCTCTTCAACGACTATGCCACATACTGCTTCCAGACC
TTTGGAGACCGTGTCAAATATTGGATTACAATTCACAACCCTTACCTTGTTGCTTGG
CATGGGTTTGGCACAGGTATGCATGCACCAGGAGAGAAGGGAAATTTAACAGCTGTC
TACACTGTGGGACACAACCTGATCAAGGCACATTCGAAAGTGTGGCATAACTACGAC
AAAAACTTCCGCCCTCATCAGAAGGGTTGGCTCTCCATCACCTTGGGGTCCCATTGG
ATAGAGCCAAACAGAACAGACAACATGGAGGACGTGATCAACTGCCAGCACTCCATG

TCCTCTGTGCTTGGATGGTTCGCCAACCCCATCCACGGGGACGGCGACTACCCTGAG
TTCATGAAGACGGGCGCCATGATCCCCGAGTTCTCTGAGGCAGAGAAGGAGGAGGTG
AGGGGCACGGCTGATTTCTTTGCCTTTTCCTTCGGGCCCAACAACTTCAGGCCCTCA
AACACCGTGGTGAAAATGGGACAAAATGTATCACTCAACTTAAGGCAGGTGCTGAAC
TGGATTAAACTGGAATACGATGACCCTCAAATCTTGATTTCGGAGAACGGCTGGTTC
ACAGATAGCTATATAAAGACAGAGGACACCACGGCCATCTACATGATGAAGAATTTC
CTAAACCAGGTTCTTCAAGCAATAAAATTTGATGAAATCCGCGTGTTTGGTTATACG
GCCTGGACTCTCCTGGATGGCTTTGAGTGGCAGGATGCCTATACGACCCGACGAGGG
CTGTTTTATGTGGACTTTAACAGTGAGCAGAAAGAGAGGAAACCCAAGTCCTCGGCT
CATTACTACAAGCAGATCATACAAGACAACGGCTTCCCTTTGAAAGAGTCCACGCCA
GACATGAAGGGTCGGTTCCCCTGTGATTTCTCTTGGGGAGTCACTGAGTCTGTTCTT
AAGCCCGAGTTTACGGTCTCCTCCCCGCAGTTTACCGATCCTCACCTGTATGTGTGG
AATGTCACTGGCAACAGATTGCTCTACCGAGTGGAAGGGGTAAGGCTGAAAACAAGA
CCATCCCAGTGCACAGATTATGTGAGCATCAAAAAACGAGTTGAAATGTTGGCAAAA
ATGAAAGTCACCCACTACCAGTTTGCTCTGGACTGGACCTCTATCCTTCCCACTGGC
AATCTGTCCAAAGTTAACAGACAAGTGTTAAGGTACTATAGGTGTGTGGTGAGCGAA
GGACTGAAGCTGGGCGTCTTCCCCATGGTGACGTTGTACCACCCAACCCACTCCCAT
CTCGGCCTCCCCCTGCCACTTCTGAGCAGTGGGGGGTGGCTAAACATGAACACAGCC
AAGGCCTTCCAGGACTACGCTGAGCTGTGCTTCCGGGAGTTGGGGGACTTGGTGAAG
CTCTGGATCACCATCAATGAGCCTAACAGGCTGAGTGACATGTACAACCGCACGAGT
AATGACACCTACCGTGCAGCCCACAACCTGATGATCGCCCATGCCCAGGTCTGGCAC
CTCTATGATAGGCAGTATAGGCCGGTCCAGCATGGGGCTGTGTCGCTGTCCTTACAT
TGCGACTGGGCAGAACCTGCCAACCCCTTTGTGGATTCACACTGGAAGGCAGCCGAG
CGCTTCCTCCAGTTTGAGATCGCCTGGTTTGCAGATCCGCTCTTCAAGACTGGCGAC
TATCCATCGGTTATGAAGGAATACATCGCCTCCAAGAACCAGCGAGGGCTGTCTAGC
TCAGTCCTGCCGCGCTTCACCGCGAAGGAGAGCAGGCTGGTGAAGGGTACCGTCGAC
TTCTACGCACTGAACCACTTCACTACGAGGTTCGTGATACACAAGCAGCTGAACACC
AACCGCTCAGTTGCAGACAGGGACGTCCAGTTCCTGCAGGACATCACCCGCCTAAGC
TCGCCCAGCCGCCTGGCTGTAACACCCTGGGGAGTGCGCAAGCTCCTTGCGTGGATC
CGGAGGAACTACAGAGACAGGGATATCTACATCACAGCCAATGGCATCGATGACCTG
GCTCTAGAGGATGATCAGATCCGAAAGTACTACTTGGAGAAGTATGTCCAGGAGGCT
CTGAAAGCATATCTCATTGACAAGGTCAAAATCAAAGGCTACTATGCATTCAAACTG
ACTGAAGAGAAATCTAAGCCTAGATTTGGATTTTTCACCTCTGACTTCAGAGCTAAG
TCCTCTGTCCAGTTTTACAGCAAGCTGATCAGCAGCAGTGGCCTCCCCGCTGAGAAC

AGAAGTCCTGCGTGTGGTCAGCCTGCGGAAGACACAGACTGCACCATTTGCTCATTT
CTCGTGGAGAAGAAACCACTCATCTTCTTCGGTTGCTGCTTCATCTCCACTCTGGCT
GTACTGCTATCCATCACCGTTTTTCATCATCAAAAGAGAAGAAAATTCCAGAAAGCA
AGGAACTTACAAAATATACCATTGAAGAAAGGCCACAGCAGAGTTTTCAGCTAA
(SEQ ID №: 469).

Приведена аминокислотная последовательность полноразмерного β-Клото мыши (номер доступа в GenBank NP_112457):

MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRAVTG
FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDG
RGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWP
RLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPLTLQEEYGG
WKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMHAPGEK
GNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTDN
MEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEKEEVRGT
ADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWIKLEYDDPQILISENG
WFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFEWQD
AYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFP
CDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPS
QCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCV
VSEGLKLGVFPMVTLYHPTHSHLGLPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCF
RELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQY
RPVQHGAVSLSLHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDY
PSVMKEYIASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHK
QLNTNRSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRKLLAWIRRNYRDRDIY
ITANGIDDLALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEEKS
KPRFGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSF
LVEKKPLIFFGCCFISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSR
VFS (SEQ ID №: 468).

Как описано здесь, белки β-Клото также могут включать фрагменты. При использовании здесь эти термины употребляются как взаимозаменяемые для обозначения ко-рецептора, в частности и если не указано иначе, ко-рецептора человека, который при

ассоциации с FGFR1c и FGF21 индуцирует активность, связанную с FGF21-подобным сигналлингом.

Термин β-Клото также включает пост-трансляционные модификации аминокислотной последовательности β-Клото, например, возможные сайты N-гликозилирования. Таким образом, антиген-связывающие белки могут связываться с белками или быть получены из белков, гликозилированных по одному или нескольким положениям.

Антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с одной или более из молекул β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4c

Предложен ряд селективно связывающихся агентов, полезных для модулирования FGF21-подобного сигналлинга. Эти агенты включают, например, антиген-связывающие белки, которые содержат антиген-связывающий домен *(например*, одноцепочечные антитела, доменные антитела, полуантитела, иммуноадгезивные молекулы и полипептиды с антиген-связывающей областью) и специфично связываются с FGFR1c, β-Клото или как с FGFR1c, так и с β-Клото, в частности, FGFR1c человека и β-Клото человека. Некоторые из антигенов, например, полезны при имитации эффекта сигналлинга, вызываемого *in vivo* ассоциацией FGFR1c с β-Клото и с FGF21, и могут, таким образом, применяться для усиления или модуляции одной или нескольких активностей, связанных с FGF21-подобным сигналлингом.

В общем случае предложенные антиген-связывающие белки, обычно содержат одну или несколько областей CDR, как описано здесь *(например,* 1, 2, 3, 4, 5 или 6 областей CDR). В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающие белки являются природными белками, экспрессируемыми клонами, тогда как в других вариантах воплощения антиген-связывающий белок может содержать (а) полипептидную каркасную структуру и (б) одну или несколько областей CDR, которые вставлены в полипептидную каркасную структуру и/или присоединены к ней. В некоторых из этих вариантов воплощения область CDR образует компонент

тяжелой или легкой цепей, экспрессируемых клонами, описанными здесь; в других вариантах воплощения область CDR может быть вставлена в каркас, в котором в природе область CDR не экспрессируется. Полипептидная каркасная структура может принимать ряд различных форм. Например, полипептидная каркасная структура может являться каркасной структурой или содержать каркасную структуру антитела природного происхождения или его фрагмента, или варианта, или же она может быть полностью синтетической по своей природе. Примеры различных структур антиген-связывающих белков дополнительно описаны ниже.

В некоторых вариантах воплощения, в которых антиген-связывающий белок содержит (а) полипептидную каркасную структуру и (б) одну или несколько областей CDR, которые вставлены в полипептидную каркасную структуру и/или присоединены к ней, полипептидная каркасная структура антиген-связывающего белка является антителом или происходит из антитела, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, биспецифичные антитела, мини-антитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые здесь "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела со сшивками (иногда называемые в этом документе "конъюгатами антител") и части или фрагменты каждого типа молекул, соответственно. В некоторых случаях антиген-связывающий белок является иммунологическим фрагментом антитела *(например,* Fab, Fab', $F(ab')_2$ или scFv).

Некоторые из раскрытых здесь антиген-связывающих белков специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, включая принадлежащие человеку формы этих белков. В одном из вариантов воплощения антиген-связывающий белок специфично связывается как с FGFR1c человека, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID №: 5, так и с β-Клото человека,

содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID №: 8, и в еще одном варианте воплощения антиген-связывающий белок специфично связывается как с FGFR1c человека, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID №: 5, так и с β-Клото человека, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID №: 8, и индуцирует FGF21-подобный сигналлинг. Таким образом, антиген-связывающий белок может, но необязательно, индуцировать FGF21-подобный сигналлинг.

Структура антиген-связывающих белков

Некоторые предложенные здесь антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, включая принадлежащие человеку формы этих белков, обладают структурой, в типичном случае связанной с антителами природного происхождения. Структурные единицы этих антител в типичном случае содержат один или более тетрамеров, каждый из которых состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, хотя некоторые виды млекопитающих также продуцируют антитела, содержащие только единичную тяжелую цепь. В составе типичного антитела каждая пара включает одну полноразмерную "легкую" цепь (в некоторых вариантах воплощения размером примерно 25 кДа) и одну полноразмерную "тяжелую" цепь (в некоторых вариантах воплощения размером примерно 50-70 кДа). Каждая индивидуальная цепь иммуноглобулина состоит из нескольких "доменов иммуноглобулина", каждый из которых состоит примерно из 90-110 аминокислот и имеет характерные особенности фолдинга. Эти домены представляют собой основные единицы, из которых состоят полипептиды антител. Амино-концевая часть каждой цепи в типичном случае включает вариабельный домен, который отвечает за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть эволюционно более консервативна, чем другой конец цепи и называется "консервативной областью" или "С-областью". У

человека легкие цепи обычно классифицируют как легкие цепи каппа ("к") и лямбда ("λ"), и каждая из этих цепей содержит один вариабельный домен и один консервативный домен. Тяжелые цепи в типичном случае классифицируют как цепи мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA или IgE, соответственно. IgG имеет несколько подтипов, включая, но не ограничиваясь этим, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Подтипы IgM включают IgM и IgM2. Подтипы IgA включают IgA1 и IgA2. У человека изотипы IgA и IgD содержат четыре тяжелые цепи и четыре легкие цепи; изотипы IgG и IgE содержат две тяжелые цепи и две легкие цепи; и изотип IgM содержат пять тяжелых цепей и пять легких цепей. С-область тяжелой цепи в типичном случае содержит один или несколько доменов, которые могут отвечать за эффекторную функцию. Количество доменов консервативной области тяжелой цепи будет зависеть от изотипа. Каждая тяжелая цепь в IgG, например, содержит три домена С-области, называемые C_H1, C_H2 и C_H3. Предложенные антитела могут иметь любой из этих изотипов и подтипов. В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающий белок, который специфично связывается с одной или несколькими молекулами из (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, является антителом подтипа IgG1, IgG2 или IgG4.

В полноразмерных легкой и тяжелой цепях вариабельные и консервативные области соединены "J"-областью длиной примерно двенадцать или более аминокислот, а в состав тяжелой цепи также входит "D"-область длиной примерно десять или более аминокислот. *См., например,* Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press (содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки). Вариабельные области каждой пары легкой и тяжелой цепей в типичном случае образуют антиген-связывающий сайт.

Один пример консервативного домена тяжелой цепи IgG2 из примера моноклонального антитела, которое специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, имеет аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCV
ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID №: 9).

Один пример консервативного домена легкой цепи каппа из примера моноклонального антитела, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, имеет аминокислотную последовательность:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID №: 10).

Один пример консервативного домена легкой цепи лямбда из примера моноклонального антитела, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, имеет аминокислотную последовательность:

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG
VETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE
CS (SEQ ID №: 11).

Вариабельные области цепей иммуноглобулинов в общем случае демонстрируют одну и ту же общую структуру, содержащую относительно консервативные каркасные области (FR), соединенные тремя гипервариабельными областями, чаще называемыми "областями, определяющими комплементарность" или областями CDR. Области CDR из двух цепей каждой пары легкой и тяжелой цепей, упомянутой выше, в типичном случае упорядочены каркасными областями с образованием структуры, которая специфично связывается со специфическим эпитопом на целевом белке *(например,* (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексе, содержащем β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4). В направлении от N-конца к С-концу вариабельные области легких и тяжелых цепей природного происхождения в типичном случае располагаются в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Для назначения номеров аминокислотам, расположенным в определенных положениях каждого из этих доменов, была разработана система нумерации. Эта система нумерации описана в публикации: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 и 1991, NIH, Bethesda, MD). При необходимости области CDR также можно дополнительно определять в соответствии с альтернативной схемой номенклатуры, такой как схема Клотиа (см. Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883 или Honegger & Pluckthun, 2001, J. *Mol. Biol.* 309:657-670.

Различные вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антиген-связывающих белков, предложеных здесь, изображены в таблице 2. Каждая из этих вариабельных областей может быть присоединена к вышеуказанным консервативным областям тяжелой и легкой цепей с образованием полноразмерной тяжелой и легкой цепи антитела, соответственно. Дополнительно каждая из полученных таким образом последовательностей тяжелой и легкой цепей может быть скомбинирована с образованием структуры полного антитела. Следует понимать, что вариабельные области

тяжелой цепи и легкой цепи, предложенные здесь, также могут быть присоединены к другим консервативным доменам, имеющим иные последовательности, чем перечисленные выше в качестве примера последовательности.

Предложены конкретные примеры воплощения некоторых полноразмерных легких и тяжелых цепей антител, и соответствующие им аминокислотные последовательности резюмированы в таблицах 1A и 1B. Таблица 1A демонстрирует примеры последовательностей легких цепей, а таблица 1B – примеры последовательностей тяжелых цепей.

Таблица 1А - Примеры последовательностей легких цепей антител

SEQ ID №:	Обозначение	Содержится в клоне	Аминокислотная последовательность
12	**L1**	17C3	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSQSVHWYQQKPG QAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG VETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
13	**L2**	22H5	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSQSVHWYQQKPG QAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVWDNTSDHVVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG VETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
14	**L3**	16H7 24H11	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSESVHWYQQKPG QAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG VETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS

SEQ ID №:	Обозна-чение	Содержится в клоне	Аминокислотная последовательность
15	**L4**	18G1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNFDSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGIGSGTDFTLTINRLE PEDFAMYYCQQYGGSPLTFGGGTEVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
16	**L5**	17D8	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSGNYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
17	**L6**	26H11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSGNYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAMYYCQQYGSSPLTFGGGSKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID №:	Обозна-чение	Содержится в клоне	Аминокислотная последовательность
18	**L7**	12E4	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNFDSNYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDNFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAMYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
19	**L8**	12C11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNFDSSSLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAMYYCQQCGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
20	**L9**	21H2 21B4	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWHQQK PGQGLRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSFTFGGGTRVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
21	**L10**	18B11.1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYYNGFTYLDW FLQKPGQSPHLLIYLGSNRASGVPDRFSGSVSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSLQTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID №:	Обозна-чение	Содержится в клоне	Аминокислотная последовательность
22	**L11**	18B11.2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVNSNLAWYQQKP GQAPRLLIYGVSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIRSLQS EDFAVYYCQQYNNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
23	**L12**	20D4	DIQLTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQDIRYDLGWYQQKP GKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTVSSLQP EDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKVEIERTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
24	**L13**	46D11	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISIWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQANDFPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
25	**L14**	40D2	DFVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLQSDGKTYLYW YLQKPGQPPHLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
26	**L15**	37D3	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNFLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSDRASGVPDRFSGSGSGTEFTLKI SRVEAEDVGLYYCMQALQTPCSFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ

SEQ ID №:	Обозна-чение	Содержится в клоне	Аминокислотная последовательность
			SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	**L16**	39F7	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSGSSPLTFGGGTEVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
28	**L17**	39F11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQK PGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
29	**L18**	39G5	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASFRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 1B- Примеры последовательностей тяжелых цепей антител

SEQ ID №:	Обозначение	Содержится в клоне	Последовательность
30	H1	17C3	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARILLLGAYYYYGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	H2	22H5	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARILLVGAYYYCGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	Обозначение	Содержится в клоне	Последовательность
32	**H3**	16H7	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLNNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKS QVVLIMTNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
33	**H4**	24H11	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDTSKS QVVLIMTNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	Обозначе-ние	Содержится в клоне	Последовательность
34	**H5**	18G1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSTYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISGSGVSTHYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVIVYALDHWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
35	**H6**	17D8	EVQLLESGGGLVQPGGYLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVMVYVLDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	Обозначе-ние	Содержится в клоне	Последовательность
36	**H7**	26H11	EVQLLESGGGLVQPGGYLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGVSTNYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVMVYVLDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
37	**H8**	12E4 12C11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSTYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISGSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVIVYALDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	Обозначе-ние	Содержится в клоне	Последовательность
38	H9	21H2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYTSGSTNYNPSLKSRVTMSKDTSKNQF SLKLRSVTAADTAVYYCARDPDGDYYYYGMDVWGQGTSV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
39	H10	21B4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYTSGSTNYNPSLKSRVTMSIDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARDPDGDYYYYGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	Обозначе-ние	Содержится в клоне	Последовательность
40	H11	18B11.1 18B11.2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMSWVRQ APGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKTEDTAVYFCTSTYSSGWYVWDYYGMDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	H12	20D4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTDLSMHWVRQ APGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRITMTEDTSTDT AYMELSSLRSEDTAVYYCASIVVVPAAIQSYYYYYGMGV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	Обозначе-ние	Содержится в клоне	Последовательность
42	**H13**	46D11	QVTLKEAGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVNWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARVRIAGDYYYYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	**H14**	39F11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGIHWVRQ APGKGLEWVAVIWYDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRAAAGLHYYYGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	Обозначе-ние	Содержится в клоне	Последовательность
44	**H15**	39F7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQ APGKGLEWVAVIWYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRAAAGLHYYYGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	**H16**	39G5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFTFSSYGIHWVRQ APGKGLEWVAVIWYDGSDKYYGDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRAAAGLHYYYGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID №:	**Обозначе-ние**	**Содержится в клоне**	**Последовательность**
46	**H17**	40D2	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYNWSWI RQHPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLRSVTAADTAVYYCARENIVVIPAAIFAGWFDPW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	**H18**	37D3	EVHLVESGGGLAKPGGSLRLSCAASGFTFRNAWMSWVRQ APGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKTEDTAEYYCITDRVLSYYAMAVWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Повторим еще раз, что каждый из примеров тяжелых цепей (H1, H2, H3 и т.д.), перечисленных в таблицах 1B и 6A, *см. ниже*, может быть скомбинирован с любым примером легких цепей, приведенным в таблицах 1A и 6A, *см. ниже*, с образованием антитела. Примеры таких комбинаций включают H1 в сочетании с любым из вариантов L1-L18, H2 в сочетании с любым из вариантов

L1-L18, H3 в сочетании с любым из вариантов L1-LI8 и т.п. В некоторых случаях антитела включают по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь из перечисленных в таблицах 1A и 1B, и 6A, *см. ниже;* конкретные примеры образования пар легких цепей и тяжелых цепей включают L1 с H1, L2 с H2, L3 с H3, L4 с H4, L5 с H5, L6 с H6, L7 с H7, L8 с H8, L9 с H9, L10 с H10, L11 с H11, L12 с H12, L13 с H13, L14 с H14, L15 с H15, L16 с H16, L17 с H17 и L18 с H18. В дополнение к антиген-связывающим белкам, содержащим тяжелую и легкую цепь из одного и того же клона, тяжелая цепь из первого клона может быть скомбинирована в пару с легкой цепью из второго клона *(например,* тяжелая цепь из 46D11 образует пару с легкой цепью из 16H7 или тяжелая цепь из 16H7 образует пару с легкой цепью из 46D11). В общем случае такое формирование пар может включать вариант, когда VL с 90% или большей гомологией может быть скомбинирована в пару с тяжелой цепью из клона природного происхождения. В некоторых случаях антитела содержат две различные тяжелые цепи и две различные легкие цепи, перечисленные в таблицах 1A и 1B, и 6A, *см. ниже.* В других случаях антитела содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи. В качестве примера, антитело или иммунологически функциональный фрагмент могут включать две H1-тяжелые цепи и две L1-легкие цепи или две H2-тяжелые цепи и две L2-легкие цепи, или две H3-тяжелые цепи и две L3-легкие цепи и другие похожие комбинации пар легких цепей и пар тяжелых цепей, перечисленных в таблицах 1A и 1B, и 6A, *см. ниже.*

Согласно еще одному аспекту рассматриваемого изобретения предложены "полуантитела". Полуантитело – это моновалентный антиген-связывающий белок, содержащий (i) интактную легкую цепь и (ii) тяжелую цепь, сшитую с Fc-областью *(например,* Fc-областью из IgG2 с SEQ ID №: 441), необязательно, посредством линкера. В качестве линкера может выступать линкер $(G_4S)_x$, где "x" – целое число, отличающееся от нуля *(например,* $(G_4S)_8$; SEQ

ID №: 440). Полуантитела могут быть сконструированы с применением предложенных компонентов тяжелых и легких цепей. Конкретные примеры воплощения полуантител раскрыты в примере 14.

Другие предложенные антиген-связывающие белки являются вариантами антител, образованных сочетанием тяжелых и легких цепей, приведенных в таблицах 1A и 1B, и 6A, *см. ниже,* и содержат легкие и/или тяжелые цепи, каждая из которых имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно аминокислотных последовательностей этих цепей. В некоторых случаях такие антитела включают по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, тогда как в других случаях вариантная форма содержит две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи.

Вариабельные домены антиген-связывающих белков

Также предложены антиген-связывающие белки, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи антитела, выбранную из группы, состоящей из: V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11 V_H12, V_H13, V_H14, V_H15, V_H16, V_H17 и V_H18, как показано в таблице 2B, и/или вариабельную область легкой цепи антитела, выбранную из группы, состоящей из: V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 и V_L18, как показано в таблице 2A, и иммунологически функциональные фрагменты, производные, мутантные формы и варианты этих вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи.

Таблица 2A - Примеры вариабельных доменов легких (V_L) цепей антител

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Аминокислотная последовательность

Содержится в клоне	**Обозначение**	**SEQ ID №**	**Аминокислотная последовательность**
17C3	**V_L1**	48	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSQSVHWYQQKP GQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
22H5	V_L2	49	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSQSVHWYQQKP GQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDNTSDHVVFGGGTKLTVL
16H7 24H11	V_L3	50	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSESVHWYQQKP GQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVL
18G1	V_L4	51	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNFDSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGIGSGTDFTLTINR LEPEDFAMYYCQQYGGSPLTFGGGTEVEIK
17D8	V_L5	52	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSGNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYGSAPLTFGGGTKVEIK
26H11	V_L6	53	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSGNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAMYYCQQYGSSPLTFGGGSKVEIK
12E4	V_L7	54	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNFDSNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDNFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAMYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK
12C11	V_L8	55	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNFDSSSLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAMYYCQQCGSSPLTFGGGTKVEIK

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Аминокислотная последовательность
21H2 21B4	V_L9	56	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWHQQ KPGQGLRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYGSSFTFGGGTRVEIK
18B11.1	**V_L10**	57	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYYNGFTYLD WFLQKPGQSPHLLIYLGSNRASGVPDRFSGSVSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQSLQTPFTFGPGTKVDIK
18B11.2	**V_L11**	58	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVNSNLAWYQQK PGQAPRLLIYGVSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIRSL QSEDFAVYYCQQYNNWPPTFGQGTKVEIK
20D4	**V_L12**	59	DIQLTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQDIRYDLGWYQQK PGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTVSSL QPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKVEIE
46D11	**V_L13**	60	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISIWLAWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQANDFPITFGQGTRLEIK
40D2	**V_L14**	61	DFVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLQSDGKTYLY WYLQKPGQPPHLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEIK
37D3	**V_L15**	62	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNFLD WYLQKPGQSPQLLIYLGSDRASGVPDRFSGSGSGTEFTL KISRVEAEDVGLYYCMQALQTPCSFGQGTKLEIK
39F7	**V_L16**	63	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQSGSSPLTFGGGTEVEIK

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Аминокислотная последовательность
39F11	V_L17	64	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQSGSSPLTFGGGTKVEIK
39G5	V_L18	65	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASFRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQSGSSPLTFGGGTKVEIK

Таблица 2B - Примеры вариабельных доменов тяжелых (V_H) цепей антител

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Аминокислотная последовательность
17C3	V_H1	66	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARILLLGAYYYYGMDVWGQG TTVTVSS
22H5	V_H2	67	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARILLVGAYYYCGMDVWGQG TTVTVSS
16H7	V_H3	68	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLNNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKS QVVLIMTNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMDVWGQG TTVTVSS
24H11	V_H4	69	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWI RQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDTSKS QVVLIMTNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMDVWGQG TTVTVSS

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Аминокислотная последовательность
18G1	V_H5	70	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGVSTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVIVYALDHWGQGTLVTVSS
17D8	V_H6	71	EVQLLESGGGLVQPGGYLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVMVYVLDYWGQGTLVTVSS
26H11	V_H7	72	EVQLLESGGGLVQPGGYLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGVSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVMVYVLDYWGQGTLVTVSS
12E4 12C11	V_H8	73	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLIVVIVYALDYWGQGTLVTVSS
21H2	V_H9	74	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTSGSTNYNPSLKSRVTMSKDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDPDGDYYYYGMDVWGQGTSVTVSS

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Аминокислотная последовательность
21B4	V_H10	75	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTSGSTNYNPSLKSRVTMSIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPDGDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
18B11.1	V_H11	76	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYFCTSTYSSGWYVWDYYGMDVWGQGTTVTVSS
18B11.2	V_H11	77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYFCTSTYSSGWYVWDYYGMDVWGQGTTVTVSS
20D4	V_H12	78	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTDLSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRITMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCASIVVVPAAIQSYYYYYGMGVWGQGTTVTVSS
46D11	V_H13	79	QVTLKEAGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVNWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARVRIAGDYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
40D2	V_H14	80	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYNWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARENIVVIPAAIFAGWFDPWGQGTLVTVSS

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Аминокислотная последовательность
37D3	V_H15	81	EVHLVESGGGLAKPGGSLRLSCAASGFTFRNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAEYYCITDRVLSYYAMAVWGQGTTVTVSS
39F7	V_H16	82	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRAAAGLHYYYGMDVWGQGTTVTVSS
39F11	V_H17	83	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRAAAGLHYYYGMDVWGQGTTVTVSS
39G5	V_H18	84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFTFSSYGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSDKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRAAAGLHYYYGMDVWGQGTTVTVSS

Таблица 2C - Кодирующая последовательность вариабельных доменов легких цепей (V_L) антитела

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
17C3	**V_L1**	85	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCC CCAGGTCAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAAC ATTGGAAGTCAGAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCA GGCCAGGCCCCTGTCCTGGTCGTCTATGATGATAGCGAC CGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAC TCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAA GCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAT AGTAGTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAG CTGACCGTCCTA
22H5	V_L2	86	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCC CCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAAC ATTGGAAGTCAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCA GGCCAGGCCCCTGTCCTGGTCGTCTATGATGATAGCGAC CGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAC TCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAA GCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAT AATACTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGGGGGACCAAA CTGACCGTCCTA
16H7 24H11	V_L3	87	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCC CCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAAC ATTGGAAGTGAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCA GGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGAC CGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAC TCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAA GCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAT GGTAATAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAG CTGACCGTCCTA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
18G1	V_L4	88	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAATTTTGACAGCAGTTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGGTACA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC ATTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAACAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAGCAG TATGGTGGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCGAG GTGGAAATCAAA
17D8	V_L5	89	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCGGCAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTATTGTCAGCAG TATGGTAGCGCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAAATCAAA
26H11	V_L6	90	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCGGCAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGATTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTATTGTCAGCAG TATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGTCCAAG GTGGAGATCAAA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
12E4	V_L7	91	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAATTTCGACAGCAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAGCCTGGCCAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAACTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAGCAG TATGGTAGTTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAAATCAAA
12C11	V_L**8**	92	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGGGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAATTTTGACAGCAGCTCCTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAGCAG TGTGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAAATCAAA
21H2 21B4	V_L**9**	93	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGTACCTACTTAGCCTGGCACCAGCAG AAACCTGGCCAGGGTCTTAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTTACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAG TATGGAAGCTCATTCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTG GAGATCAAA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
18B11.1	V_L10	94	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTC ACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGT CAGAGCCTCCTGTATTATAATGGATTCACCTATTTGGAT TGGTTCCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACATCTCCTG ATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGAC AGGTTCAGTGGCAGTGTTTCAGGCACAGATTTTACACTG AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTAT TATTGCATGCAGTCTCTGCAAACTCCATTCACTTTCGGC CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
18B11.2	V_L11	95	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAACAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATTTATGGTGTATCC ACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGT GGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCCGCAGCCTG CAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTAT AATAACTGGCCTCCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG GAAATCAAA
20D4	V_L12	96	GACATACAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT CAGGACATTAGATATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCTTCAAGGTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAGTCAGCAGCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCAT AATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCGAA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
46D11	V_L13	97	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCTTCCGTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGT CAGGGTATTAGCATCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA CCTGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCT AACGATTTCCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTG GAGATTAAA
40D2	V_L14	98	GATTTTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTC ACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGT CAGAGCCTCCTACAGAGTGATGGAAAGACCTATTTGTAT TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACATCTCCTG ATCTATGAAGTTTCCAACCGATTCTCTGGAGTGCCAGAT AGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTG AAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTAT TACTGCATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACGTTCGGC CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
37D3	V_L15	99	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTC ACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGT CAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTTTTTGGAT TGGTACCTACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTG ATCTATTTGGGTTCTGATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGAC AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGAGTTTACACTG AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGCTTTAT TACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGTGCAGTTTTGGC CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
39F7	V_L16	100	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGTAGCACCTATTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG TCTGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCGAG GTGGAGATCAAA
39F11	**V_L17**	101	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCACCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGTCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAGGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAG TCTGGTAGCTCACCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAA
30G5	**V_L18**	102	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCACCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCTTCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAGGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAG TCTGGTAGCTCACCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAA

Таблица 2D - Кодирующая последовательность вариабельных доменов тяжелых цепей (V_H) антитела

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
17C3	V_H1	103	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAA CCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGG TTCTCACTCAGCAATGCTAGAATGGGTGTGAGCTGGATC CGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACAC ATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTG AAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGC CAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGAC ACAGCCACATATTACTGTGCACGGATATTATTACTGGGA GCTTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA
22H5	V_H2	104	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAA CCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGG TTCTCACTCAGCAATGCTAGAATGGGTGTGAGCTGGATC CGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACAC ATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTG AAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGC CAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGAC ACAGCCACATATTACTGTGCACGGATATTATTAGTGGGA GCTTACTACTACTGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
16H7	V_H3	105	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAA CCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGG TTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGTGTGAGCTGGATC CGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACAC ATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTG AAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGC CAGGTGGTCCTAATTATGACCAACATGGACCCTGTGGAC ACAGCCACATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGC GGCTACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA
24H11	V_H4	106	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAA CCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGG TTCTCACTCAGCAATGCTAGAATGGGTGTGAGCTGGATC CGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACAC ATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTG AAGAACAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGC CAGGTGGTCCTTATTATGACCAACATGGACCCTGTGGAC ACAGCCACATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTGACTGGC GGCTACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA
18G1	**V_H5**	107	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGGTTGGTACAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTAGA TTCACCTTTAGCACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGT GGTAGTGGTGTCAGCACACACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTATATTACTGTGCGAAATCCCTCATTGTAGTAATA GTATATGCCCTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
17D8	V_H6	108	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCGGGGGGGTACCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACGTTTAGTACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCTCAGCTATCAGT GGTAGTGGTGTTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTATATTACTGTGCGAAATCCCTTATTGTAGTAATG GTGTATGTCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
26H11	V_H7	109	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCGGGGGGGTACCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACGTTTAGCACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGT GGCAGTGGTGTGAGCACAAACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTATATTACTGTGCGAAATCCCTTATTGTAGTAATG GTGTATGTCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
12E4 12C11	V_H8	110	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGGTTGGTACAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTAGA TTCACCTTTAGCACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGT GGTAGTGGTGTTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTATATTACTGTGCGAAATCCCTTATTGTAGTAATA GTATATGCCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
21H2	V_H9	111	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT GGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAG CCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATCTAT ACCAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGT CGGGTCACCATGTCAAAAGACACGTCCAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGGACGGTGACTACTAC TACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCTCGGTC ACCGTCTCCTCA
21B4	V_H10	112	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT GGCTCCATCAGTAGTTACTTCTGGAGCTGGATCCGGCAG CCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATCTAT ACCAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGT CGAGTCACCATGTCAATAGACACGTCCAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGGACGGTGACTACTAC TACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCTCA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
18B11.1 18B11.2	V_H11	113	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAG CCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACTTTCAGTGACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAA AGCAAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCC GTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAA AACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAG GACACAGCCGTGTATTTTTGTACCTCTACGTATAGCAGT GGCTGGTACGTATGGGACTACTACGGTATGGACGTCTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
20D4	V_H12	114	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCGGGA TACACCCTCACTGATTTATCCATGCACTGGGTGCGACAG GCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGAT CCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTCCAG GGCAGAATCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCAAGTATTGTAGTAGTCCCAGCT GCTATACAGAGTTACTACTACTACTACGGTATGGGCGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCC

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
46D11	V_H13	115	CAGGTCACCTTGAAGGAGGCTGGTCCTGTGTTGGTGAAA CCCACAGAGACCCTCACGTTGACCTGCACCGTCTCTGGG TTCTCACTCAGCAATGCTAGAATGGGTGTGAACTGGATC CGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACAC ATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTG AAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGC CAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGAC ACAGCCACATATTACTGTGCACGGGTTCGTATAGCAGGT GATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
40D2	V_H14	116	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT GGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACAACTGGAGCTGGATC CGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAAC ATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAC CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGATCTGTGACTGCCGCGGAC ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAATATTGTAGTA ATACCAGCTGCTATATTCGCGGGTTGGTTCGACCCCTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
37D3	V_H15	117	GAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGCAAAG CCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACTTTCAGAAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGAAAGGGGCTGGAATGGGTTGGCCGTATTAAA AGCAAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCC GTGAAAGGCAGATTCACCATCTCGAGAGATGATTCAAAA AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAG GACACAGCCGAGTATTACTGTATCACAGATCGGGTGCTA AGCTACTACGCTATGGCCGTCTGGGGCCAAGGGACCACG GTCACCGTCTCCTCA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
39F7	V_H16	118	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGA TTCACCTTCAGTAACTATGGCATTCACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGG TATGATGGAAGTATTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAG GGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGCAGCAGCTGGT CTCCACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA
39F11	V_H17	119	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGA TTCACCTTCAGTAGCTATGGCATCCACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCAGTTATATGG TATGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAG GGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGCAGCAGCTGGT CTCCACTATTATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Содержится в клоне	Обозначение	SEQ ID №	Кодирующая последовательность
39G5	V_H18	120	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTGTCTGGA TTCACCTTCAGTAGCTATGGCATCCACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCAGTTATATGG TATGATGGAAGTGATAAATACTATGGAGACTCCGTGAAG GGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGCAGCAGCTGGT CTCCACTATTATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Каждая из вариабельных областей тяжелых цепей, перечисленных в таблице 2B, может быть скомбинирована с любой их вариабельных областей легких цепей, представленных в таблице 2A, с образованием антиген-связывающего белка. Примеры таких сочетаний включают V_H1 в сочетании с любым из V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 или V_L18; V_H2 в сочетании с любым изV_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 или V_L18; V_H3 в сочетании с любым из V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 или V_L18 и т.п.

В некоторых случаях антиген-связывающий белок включает по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи и/или одну вариабельную область легкой цепи из перечисленных в таблицах 2A и 2B. В некоторых случаях антиген-связывающий белок включает по меньшей мере две разные вариабельные области тяжелой цепи и/или вариабельные области легкой цепи из перечисленных в таблице 2B. Пример такого антиген-связывающего белка содержит (а) один V_H1 и (б) один из V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12, V_{H13}, V_{H14}, V_{H15}, V_{H16}, V_{H17} или

V_{H18}. Еще один пример содержит (а) один V_H2 и (б) один из V_H1, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12, V_H13, V_H14, V_H15, V_H16, V_H17 или V_H18. Еще один дополнительный пример содержит (а) один V_H3 и (б) один из V_H1, V_H2, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12, V_H13, V_H14, V_H15, V_H16, V_H17 или V_H18 и т.д.

Еще один дополнительный пример такого антиген-связывающего белка содержит (а) один V_L1 и (б) один из V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 или V_L18. Еще один дополнительный пример такого антиген-связывающего белка содержит (а) один V_L2 и (б) один из V_L1, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11 или V_L12. Еще один дополнительный пример такого антиген-связывающего белка содержит (а) один V_L3 и (б) один из V_L1, V_L2, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 или V_L18 и т.д.

Различные сочетания вариабельных областей тяжелых цепей могут быть скомбинированы с любым из различных сочетаний вариабельных областей легких цепей.

В других вариантах воплощения антиген-связывающий белок содержит две идентичные вариабельные области легкой цепи и/или две идентичные вариабельные области тяжелой цепи. В качестве примера, антиген-связывающий белок может являться антителом или его иммунологически функциональным фрагментом, который включает две вариабельные области легкой цепи и две вариабельные области тяжелой цепи, в сочетании пар вариабельных областей легкой цепи и пар вариабельных областей тяжелой цепи, как перечислено в таблицах 2A и 2B.

Некоторые предложенные антиген-связывающие белки содержат вариабельный домен тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот, которая отличается от последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, выбранного из V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12, V_H13, V_H14, V_H15, V_H16, V_H17 и V_H18 только по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14 или 15 аминокислотным остаткам, при этом каждое такое различие последовательностей независимо является либо делецией, либо вставкой, либо заменой одной аминокислоты, при условии, что делеции, вставки и/или замены приводят к изменению не более чем 15 аминокислот относительно вышеупомянутых последовательностей вариабельных доменов. Вариабельная область тяжелой цепи в некоторых антиген-связывающих белках содержит последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности относительно аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12, V_H13, V_H14, V_H15, V_H16, V_H17 и V_H18.

Определенные антиген-связывающие белки содержат вариабельный домен легкой цепи, включающий последовательность аминокислот, которая отличается от последовательности вариабельного домена легкой цепи, выбранного из V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 и V_L18 только по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотным остаткам, при этом каждое такое различие последовательностей независимо является либо делецией, либо вставкой, либо заменой одной аминокислоты, при условии, что делеции, вставки и/или замены приводят к изменению не более чем 15 аминокислот относительно вышеупомянутых последовательностей вариабельных доменов. Вариабельная область легкой цепи в некоторых антиген-связывающих белках содержит последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности относительно аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 или V_L18.

В дополнительных примерах антиген-связывающие белки содержат следующие пары вариабельных доменов легких цепей и тяжелых

цепей: V_L1 с V_H1, V_L2 с V_H2, V_L2 с V_H3, V_L3 с V_H4, V_L4 с V_H5, V_L5 с V_H6, V_L6 с V_H7, V_L7 с V_H8, V_L8 с V_H8, V_L9 с V_H9, V_L9 с V_H10, V_L10 с V_H11, V_L11 с V_H11, V_L12 с V_H12, V_L13 с V_H13, V_L14 с V_H14, V_L15 с V_H15, V_L16 с V_H16, V_L17 с V_H17 и V_L18 с V_H18. В некоторых случаях антиген-связывающие белки в вышеуказанных парах могут содержать аминокислотные последовательности, которые обладают 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно указанных вариабельных доменов.

Другие антиген-связывающие белки, *например,* антитела или иммунологически функциональные фрагменты, включают вариантные формы вариантной тяжелой цепи и вариантной легкой цепи, как только что было описано.

Области CDR антиген-связывающих белков

В различных вариантах воплощения антиген-связывающие белки, раскрытые здесь, могут содержать полипептиды, в которых пересажены, вставлены и/или присоединены одна или более областей CDR. Антиген-связывающий белок может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 областей CDR. Таким образом, антиген-связывающий белок может содержать, например, одну область CDR1 тяжелой цепи ("CDRH1") и/или одну область CDR2 тяжелой цепи ("CDRH2"), и/или одну область CDR3 тяжелой цепи ("CDRH3"), и/или одну область CDR1 легкой цепи ("CDRL1"), и/или одну область CDR2 легкой цепи ("CDRL2"), и/или одну область CDR3 легкой цепи ("CDRL3"). Некоторые антиген-связывающие белки включают как CDRH3, так и CDRL3. Специфичные области CDR тяжелой и легкой цепей указаны в таблицах 3A и 3B, соответственно, и в таблице 6C, *см. ниже*.

Области, определяющие комплементарность (CDR), и каркасные области (FR) данного антитела можно идентифицировать с помощью системы, описанной в работе Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication № 91-

3242, 1991. При необходимости области CDR также можно дополнительно определять в соответствии с альтернативной схемой номенклатуры, такой как схема Клотиа (см. Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883 или Honegger & Pluckthun, 2001, *J. Mol. Biol.* 309:657-670). Некоторые антитела, раскрытые здесь, содержат одну или более аминокислотных последовательностей, которые идентичны или обладают существенной идентичностью последовательности относительно аминокислотных последовательностей одной или нескольких областей CDR, представленных в таблице 3A (области CDRH) и таблице 3B (области CDRL), а также в таблице 6C, *см. ниже.*

Таблица 3A- Примеры последовательностей CDRH

Клон	**SEQ ID №:**	**Содержится в образце**	**Обозначение**	**Последовательность**
20D4	121	V_H12	CDRH1-1	DLSMH
17C3 22H5 16H7 24H11	122	V_H1 V_H2 V_H3 V_H4	CDRH1-2	NARMGVS
18B11.1 18B11.2	123	V_H11 V_H11	CDRH1-3	DAWMS
18G1 12C11 12E4 17D8 26H11	124	V_H5 V_H8 V_H8 V_H6 V_H7	CDRH1-4	TYAMS
21B4	125	V_H10	CDRH1-5	SYFWS
46D11	126	V_H13	CDRH1-6	NARMGVN

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
37D3	127	V_H15	CDRH1-7	NAWMS
39F11 39G5	128	V_H17 V_H18	CDRH1-8	SYGIH
39F7	129	V_H16	CDRH1-9	NYGIH
40D2	130	V_H14	CDRH1-10	SGGYNWS
21H2	131	V_H9	CDRH1-11	SYYWS
20D4	132	V_H12	CDRH2-1	GFDPEDGETIYAQKFQG
17C3 22H5 16H7 46D11	133	V_H1 V_H2 V_H3 V_H13	CDRH2-2	HIFSNDEKSYSTSLKS
24H11	134	V_H4	CDRH2-3	HIFSNDEKSYSTSLKN
18B11.1 18B11.2 37D3	135	V_H11 V_H11 V_H15	CDRH2-4	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG
18G1	136	V_H5	CDRH2-5	GISGSGVSTHYADSVKG
12C11 12E4	137	V_H8 V_H8	CDRH2-6	GISGSGVSTYYADSVKG
17D8	138	V_H6	CDRH2-7	AISGSGVSTYYADSVKG
26H11	139	V_H7	CDRH2-8	AISGSGVSTNYADSVKG
21B4 21H2	140	V_H10 V_H9	CDRH2-9	RIYTSGSTNYNPSLKS
39F11	141	V_H17	CDRH2-10	VIWYDGSDKYYADSVKG
39F7	142	V_H16	CDRH2-11	VIWYDGSIKYYADSVKG
39G5	143	V_H18	CDRH2-12	VIWYDGSDKYYGDSVKG

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
40D2	144	V_H14	CDRH2-13	NIYYSGSTYYNPSLKS
20D4	145	V_H12	CDRH3-1	IVVVPAAIQSYYYYYGMGV
17C3	146	V_H1	CDRH3-2	ILLLGAYYYYGMDV
22H5	147	V_H2	CDRH3-3	ILLVGAYYYCGMDV
16H7 24H11	148	V_H3 V_H4	CDRH3-4	SVVTGGYYYDGMDV
18B11.1 18B11.2	149	V_H11 V_H11	CDRH3-5	TYSSGWYVWDYYGMDV
18G1	150	V_H5	CDRH3-6	SLIVVIVYALDH
12C11 12E4	151	V_H8 V_H8	CDRH3-7	SLIVVIVYALDY
17D8 26H11	152	V_H6 V_H7	CDRH3-8	SLIVVMVYVLDY
21B4 21H2	153	V_H10 V_H9	CDRH3-9	DPDGDYYYYGMDV
46D11	154	V_H13	CDRH3-10	VRIAGDYYYYYGMDV
37D3	155	V_H15	CDRH3-11	DRVLSYYAMAV
39F11 39F7 39G5	156	V_H17 V_H16 V_H18	CDRH3-12	DRAAAGLHYYYGMDV
40D2	157	V_H14	CDRH3-13	ENIVVIPAAIFAGWFDP

Таблица 3B - Примеры последовательностей CDRL

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
20D4	158	V_L12	CDRL1-1	RASQDIRYDLG
18B11.1	159	V_L10	CDRL1-2	RSSQSLLYYNGFTYLD
12C11	160	V_L8	CDRL1-3	RASQNFDSSSLA
18G1	161	V_L4	CDRL1-4	RASQNFDSSYLA
17D8 26H11	162	V_L5 V_L6	CDRL1-5	RASQSVSGNYLA
21B4 21H2 39F7 39F11 39G5	163	V_L9 V_L9 V_L16 V_L17 V_L18	CDRL1-6	RASQSVSSTYLA
12E4	164	V_L7	CDRL1-7	RASQNFDSNYLA
18B11.2	165	V_L11	CDRL1-8	RASQSVNSNLA
16H7 24H11	166	V_L3 V_L3	CDRL1-9	GGNNIGSESVH
22H5 17C3	167	V_L2 V_L1	CDRL1-10	GGNNIGSQSVH
46D11	168	V_L13	CDRL1-11	RASQGISIWLA
40D2	169	V_L14	CDRL1-12	KSSQSLLQSDGKTYLY
37D3	170	V_L15	CDRL1-13	RSSQSLLHSNGYNFLD
20D4 46D11	171	V_L12 V_L13	CDRL2-1	AASSLQS
18B11.1	172	V_L10	CDRL2-2	LGSNRAS

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
12C11 17D8 21B4 21H2 26H11 12E4 39F7 39F11	173	V_L8 V_L5 V_L9 V_L9 V_L6 V_L7 V_L16 V_L17	CDRL2-3	GASSRAT
18G1	174	V_L4	CDRL2-4	GTSSRAT
18B11.2	175	V_L11	CDRL2-5	GVSTRAT
16H7 24H11 22H5 17C3	176	V_L3 V_L3 V_L2 V_L1	CDRL2-6	DDSDRPS
40D2	177	V_L14	CDRL2-7	EVSNRFS
37D3	178	V_L15	CDRL2-8	LGSDRAS
39G5	179	V_L18	CDRL2-9	GASFRAT
20D4	180	V_L12	CDRL3-1	LQHNSYPLT
18B11.1	181	V_L10	CDRL3-2	MQSLQTPFT
12C11	182	V_L8	CDRL3-3	QQCGSSPLT
18G1	183	V_L4	CDRL3-4	QQYGGSPLT
17D8	184	V_L5	CDRL3-5	QQYGSAPLT
21B4 21H2	185	V_L9 V_L9	CDRL3-6	QQYGSSFT
26H11 12E4	186	V_L6 V_L7	CDRL3-7	QQYGSSPLT
18B11.2	187	V_L11	CDRL3-8	QQYNNWPPT

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
16H7 24H11	188	V_L3 V_L3	CDRL3-9	QVWDGNSDHVV
22H5	189	V_L2	CDRL3-10	QVWDNTSDHVV
17C3	190	V_L1	CDRL3-11	QVWDSSSDHVV
46D11	191	V_L13	CDRL3-12	QQANDFPIT
40D2	192	V_L14	CDRL3-13	MQSIQLPRT
37D3	193	V_L15	CDRL3-14	MQALQTPCS
39F7 39F11 39G5	194	V_L16 V_L17 V_L18	CDRL3-15	QQSGSSPLT

Таблица 3C - Кодирующие последовательности для областей CDRH

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначе-ние	Последовательность
20D4	195	V_H12	CDRH1-1	GATTTATCCATGCAC
17C3 22H5 16H7 24H11	196	V_H1 V_H2 V_H3 V_H4	CDRH1-2	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC
18B11.1 18B11.2	197	V_H11 V_H11	CDRH1-3	GACGCCTGGATGAGC

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначе-ние	Последовательность
18G1 12C11 12E4 17D8 26H11	198	V_H5 V_H8 V_H8 V_H6 V_H7	CDRH1-4	ACCTATGCCATGAGC
21B4 21H2	199	V_H10 V_H9	CDRH1-5	AGTTACTTCTGGAGC
46D11	200	V_H13	CDRH1-6	AATGCTAGAATGGGTGTGAAC
37D3	201	V_H15	CDRH1-7	AACGCCTGGATGAGC
39F11 39G5	202	V_H17 V_H18	CDRH1-8	AGCTATGGCATCCAC
39F7	203	V_H16	CDRH1-9	AACTATGGCATTCAC
40D2	204	V_H14	CDRH1-10	AGTGGTGGTTACAACTGGAGC
20D4	205	V_H12	CDRH2-1	GGTTTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATC T ACGCACAGAAGTTCCAGGGC
17C3 22H5 16H7 46D11	206	V_H1 V_H2 V_H3 V_H13	CDRH2-2	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAA TCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC
24H11	207	V_H4	CDRH2-3	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATC CTACAGCACATCTCTGAAGAAC
18B11.1 18B11.2 37D3	208	V_H11 V_H11 V_H15	CDRH2-4	CGTATTAAAAGCAAAACTGATGGTGGGA CAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGC

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначе-ние	Последовательность
18G1	209	V_H5	CDRH2-5	GGTATTAGTGGTAGTGGTGTCAGCACACA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
12C11 12E4	210	V_H8 V_H8	CDRH2-6	GGTATTAGTGGTAGTGGTGTTAGCACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC
17D8	211	V_H6	CDRH2-7	GCTATCAGTGGTAGTGGTGTTAGCACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC
26H11	212	V_H7	CDRH2-8	GCTATTAGTGGCAGTGGTGTGAGCACAAAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC
21B4 21H2	213	V_H10 V_H9	CDRH2-9	CGTATCTATACCAGTGGGAGCACCAACTAC A ACCCCTCCCTCAAGAGT
39F11	214	V_H17	CDRH2-10	GTTATATGGTATGATGGAAGTGATAAATAC TA TGCAGACTCCGTGAAGGGC
39F7	215	V_H16	CDRH2-11	GTTATATGGTATGATGGAAGTATTAAATAC TA TGCAGACTCCGTGAAGGGC
39G5	216	V_H18	CDRH2-12	GTTATATGGTATGATGGAAGTGATAAATAC TA TGGAGACTCCGTGAAGGGC
40D2	217	V_H14	CDRH2-13	AACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTAC AA CCCGTCCCTCAAGAGT
20D4	218	V_H12	CDRH3-1	ATTGTAGTAGTCCCAGCTGCTATACAGAGT TA CTACTACTACTACGGTATGGGCGTC

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначе-ние	Последовательность
17C3	219	V_H1	CDRH3-2	ATATTATTACTGGGAGCTTACTACTACTACGG TATGGACGTC
22H5	220	V_H2	CDRH3-3	ATATTATTAGTGGGAGCTTACTACTACTGCGG TATGGACGTC
16H7 24H11	221	V_H3 V_H4	CDRH3-4	TCAGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACG GTATGGACGTC
18B11.1 18B11.2	222	V_H11 V_H11	CDRH3-5	ACGTATAGCAGTGGCTGGTACGTATGGGAC TACTACGGTATGGACGTC
18G1	223	V_H5	CDRH3-6	TCCCTCATTGTAGTAATAGTATATGCCCTTG ACCAC
12C11 12E4	224	V_H8 V_H8	CDRH3-7	TCCCTTATTGTAGTAATAGTATATGCCCT TGACTAC
17D8 26H11	225	V_H6 V_H7	CDRH3-8	TCCCTTATTGTAGTAATGGTGTATGTCCT TGACTAC
21B4 21H2	226	V_H10 V_H9	CDRH3-9	GATCCGGACGGTGACTACTACTACTACG GTATGGACGTC
46D11	227	V_H13	CDRH3-10	GTTCGTATAGCAGGTGATTACTACTACTA CTACGGTATGGACGTC
37D3	228	V_H15	CDRH3-11	GATCGGGTGCTAAGCTACTACGCTATGG CCGTC

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначе-ние	Последовательность
39F11 39F7 39G5	229	V_H17 V_H16 V_H18	CDRH3-12	GATAGGGCAGCAGCTGGTCTCCACTATT ATTACGGTATGGACGTC
40D2	230	V_H14	CDRH3-13	GAGAATATTGTAGTAATACCAGCTGCTAT ATTCGCGGGTTGGTTCGACCCC

Таблица 3D - Кодирующие последовательности для областей CDRL

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
20D4	231	V_L12	CDRL1-1	CGGGCAAGTCAGGACATTAGATATGATT TAGGC
18B11.1	232	V_L10	CDRL1-2	AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATTATA ATGGATTCACCTATTTGGAT
12C11	233	V_L8	CDRL1-3	AGGGCCAGTCAGAATTTTGACAGCAGC TCCTTAGCC
18G1	234	V_L4	CDRL1-4	AGGGCCAGTCAGAATTTTGACAGCAGT TACTTAGCC
17D8 26H11	235	V_L5 V_L6	CDRL1-5	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGGCAAC TACTTGGCC
21B4 21H2 39F7 39F11 39G5	236	V_L9 V_L9 V_L16 V_L17 V_L18	CDRL1-6	AGGGCCAGTCAGAGTGTGAGCAGTACC TACTTAGCC
12E4	237	V_L7	CDRL1-7	AGGGCCAGTCAGAATTTCGACAGCAAC TACTTAGCC

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
18B11.2	238	V_L11	CDRL1-8	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAACAGCAAC TTAGCC
16H7 24H11	239	V_L3 V_L3	CDRL1-9	GGGGGAAACAACATTGGAAGTGAAAGTG TGCAC
22H5 17C3	240	V_L2 V_L1	CDRL1-10	GGGGGAAACAACATTGGAAGTCAAAGTG TGCAC
46D11	241	V_L13	CDRL1-11	CGGGCGAGTCAGGGTATTAGCATCTGGT TAGCC
40D2	242	V_L14	CDRL1-12	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTACAGAGTG ATGGAAAGACCTATTTGTAT
37D3	243	V_L15	CDRL1-13	AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTA ATGGATACAACTTTTTGGAT
20D4 46D11	244	V_L12 V_L13	CDRL2-1	GCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
18B11.1	245	V_L10	CDRL2-2	TTGGGTTCTAATCGGGCCTCC
12C11 17D8 21B4 21H2 26H11 12E4 39F7 39F11	246	V_L8 V_L5 V_L9 V_L9 V_L6 V_L7 V_L16 V_L17	CDRL2-3	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT
18G1	247	V_L4	CDRL2-4	GGTACATCCAGCAGGGCCACT
18B11.2	248	V_L11	CDRL2-5	GGTGTATCCACCAGGGCCACT

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
16H7 24H11 22H5 17C3	249	V_L3 V_L3 V_L2 V_L1	CDRL2-6	GATGATAGCGACCGGCCCTCA
40D2	250	V_L14	CDRL2-7	GAAGTTTCCAACCGATTCTCT
37D3	251	V_L15	CDRL2-8	TTGGGTTCTGATCGGGCCTCC
20D4	252	V_L12	CDRL3-1	CTACAGCATAATAGTTACCCTCTCACT
18B11.1	253	V_L10	CDRL3-2	ATGCAGTCTCTGCAAACTCCATTCACT
12C11	254	V_L8	CDRL3-3	CAGCAGTGTGGTAGCTCACCGCTCACT
18G1	255	V_L4	CDRL3-4	CAGCAGTATGGTGGCTCACCGCTCACT
17D8	256	V_L5	CDRL3-5	CAGCAGTATGGTAGCGCACCGCTCACT
21B4 21H2	257	V_L9 V_L9	CDRL3-6	CAGCAGTATGGAAGTTCATTCACT
26H11 12E4	258	V_L6 V_L7	CDRL3-7	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACT
18B11.2	259	V_L11	CDRL3-8	CAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGACG
16H7 24H11	260	V_L3 V_L3	CDRL3-9	CAGGTGTGGGATGGTAATAGTGATCAT GTGGTA
22H5	261	V_L2	CDRL3-10	CAGGTGTGGGATAATACTAGTGATCAT GTGGTA
17C3	262	V_L1	CDRL3-11	CAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCAT GTGGTA
46D11	263	V_L13	CDRL3-12	CAACAGGCTAACGATTTCCCGATCACC
40D2	264	V_L14	CDRL3-13	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACG
37D3	265	V_L15	CDRL3-14	ATGCAAGCTCTACAAACTCCGTGCAGT

Клон	SEQ ID №:	Содержится в образце	Обозначение	Последовательность
39F7 39F11 39G5	266	V_L16 V_L17 V_L18	CDRL3-15	CAGCAGTCTGGTAGCTCACCTCTCACT

Описана структура и особенности областей CDR в составе антитела природного происхождения, *см. выше*. Коротко, в стандартном антителе области CDR внедрены в пределах каркаса в вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи, где они представляют собой области, отвечающие за связывание и узнавание антигена. Вариабельная область содержит по меньшей мере три области CDR тяжелой или легкой цепи, *см. ранее* (Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; *см. также* Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342: 877-883), в пределах каркасной области (каркасные области 1-4 обозначают как FR1, FR2, FR3 и FR4, согласно Kabat *et al.*, 1991; *см. также* Chothia and Lesk, 1987, *см. выше*). Однако, предложенные здесь области CDR могут применяться не только для образования антиген-связывающего домена в традиционной структуре антитела, но могут быть внедрены в состав структур различных других полипептидов, как описано здесь.

По одном из аспектов настоящего изобретения предложенные области CDR являются (a) областью CDRH, выбранной из группы, состоящей из (i) области CDRH1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 121-131; (ii) области CDRH2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 132-144; (iii) области CDRH3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 145-157; и (iv) области CDRH по пп. (i), (ii) и (iii), которая содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по не более чем

пяти, четырем, трем, двум или одной аминокислоте; (б) областью CDRL, выбранной из группы, состоящей из (i) области CDRL1 выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 158-170; (ii) области CDRL2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 171-179; (iii) области CDRL3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 180-194; и (iv) области CDRL по пп. (i), (ii) и (iii), которая содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам.

Согласно другому аспекту антиген-связывающий белок содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 вариантных форм областей CDR, перечисленных в таблицах 3A и 3B, а также в таблице 6C, *см. ниже,* каждая из которых обладает по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно последовательности области CDR, перечисленной в таблицах 3A и 3B, а также в таблице 6C, *см. ниже.* Некоторые антиген-связывающие белки содержат 1, 2, 3, 4, 5 или 6 областей CDR, перечисленных в таблицах 3A и 3B, а также в таблице 6C, *см. ниже,* каждая из которых отличается не более чем на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот от областей CDR, перечисленных в этих таблицах.

Согласно еще одному аспекту антиген-связывающий белок включает следующие сочетания последовательностей CDRL1, CDRL2 и CDRL3: SEQ ID №: 167, 176 и 190; SEQ ID №: 167, 176 и 189, SEQ ID №: 166, 176 и 188; SEQ ID №: 166, 176 и 188; SEQ ID №: 161, 174 и 183; SEQ ID №: 162, 173 и 184; SEQ ID №: 162, 173 и 186; SEQ ID №: 164, 173 и 186; SEQ ID №: 160, 173 и 182; SEQ ID №: 163, 173 и 185; SEQ ID №: 163, 173 и 185; SEQ ID №: 159, 172 и 181; SEQ ID №: 165, 175 и 187; SEQ ID №: 158, 171 и 180; SEQ ID №: 168, 171 и 191; SEQ ID №: 169, 177 и 192; SEQ ID №: 170, 178 и 193; SEQ ID №: 163, 173 и 194; SEQ ID №: 163, 173 и 194; и SEQ ID №: 163, 179 и 194.

Согласно еще одному аспекту антиген-связывающий белок включает следующие сочетания последовательностей CDRH1, CDRH2 и CDRH3:

SEQ ID №:122, 133 и 146; SEQ ID №: 122, 133 и 147; SEQ ID №: 122, 133 и 148; SEQ ID №: 122, 134 и 148; SEQ ID №: 124, 136 и 150; SEQ ID №: 124, 138 и 152; SEQ ID №: 124, 139 и 152; SEQ ID №: 124, 137 и 151; SEQ ID №: 124, 137 и 151; SEQ ID №: 131, 140 и 153; SEQ ID №: 125, 140 и 153; SEQ ID №: 123, 135 и 149; SEQ ID №: 123, 135 и 149; SEQ ID №: 121, 132 и 145; SEQ ID №: 126, 133 и 154; SEQ ID №: 130, 144 и 157; SEQ ID №: 127, 135 и 155; SEQ ID №: 129, 142 и 156; SEQ ID №: 128, 141 и 156; SEQ ID №: 128, 143 и 156.

Согласно другому аспекту антиген-связывающий белок включает следующие сочетания последовательностей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 с последовательностями CDRH1, CDRH2 и CDRH3: SEQ ID №: 167, 176 и 190; SEQ ID №: 167, 176 и 189; SEQ ID №: 166, 176 и 188; SEQ ID №: 166, 176 и 188; SEQ ID №: 161, 174 и 183; SEQ ID №: 162, 173 и 184; SEQ ID №: 162, 173 и 186; SEQ ID №: 164, 173 и 186; SEQ ID №: 160, 173 и 182; SEQ ID №: 163, 173 и 185; SEQ ID №: 163, 173 и 185; SEQ ID №: 159, 172 и 181; SEQ ID №: 165, 175 и 187; SEQ ID №: 158, 171 и 180; SEQ ID №: 168, 171 и 191; SEQ ID №: 169, 177 и 192; SEQ ID №: 170, 178 и 193; SEQ ID №: 163, 173 и 194; SEQ ID №: 163, 173 и 194; SEQ ID №: 163, 179 и 194; с SEQ ID №: 122, 133 и 146; SEQ ID №: 122, 133 и 147; SEQ ID №: 122, 133 и 148; SEQ ID №: 122, 134 и 148; SEQ ID №: 124, 136 и 150; SEQ ID №: 124, 138 и 152; SEQ ID №: 124, 139 и 152; SEQ ID №: 124, 137 и 151; SEQ ID №: 124, 137 и 151; SEQ ID №: 131, 140 и 153; SEQ ID №: 125, 140 и 153; SEQ ID №: 123, 135 и 149; SEQ ID №: 123, 135 и 149; SEQ ID №: 121, 132 и 145; SEQ ID №: 126, 133 и 154; SEQ ID №: 130, 144 и 157; SEQ ID №: 127, 135 и 155; SEQ ID №: 129, 142 и 156; SEQ ID №: 128, 141 и 156; и SEQ ID №: 128, 143 и 156.

Консенсусные последовательности

Согласно еще одному аспекту области CDR, раскрытые здесь, включают консенсусные последовательности, происходящие из групп родственных моноклональных антител. Как описано здесь,

термин "консенсусные последовательности" означают аминокислотные последовательности, содержащие консервативные аминокислоты, общие для ряда последовательностей, и вариабельные аминокислоты, которые отличаются в составе данной аминокислотной последовательности. Предложенные консенсусные последовательности областей CDR включают области CDR, соответствующие каждой из областей CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

Консенсусные последовательности были определены с применением стандартного анализа областей CDR, соответствующих V_H и V_L раскрытых антител, некоторые из которых специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Консенсусные последовательности определяли, сохраняя области CDR непрерывными в пределах одной и той же последовательности, соответствующей V_H или V_L.

CDR3 легкой цепи

Группа 1

LQHNSYPLT (SEQ ID №: 267)

Группа 2

MQSLQTPFT (SEQ ID №: 268)

Группа 3

QQYNNWPPT (SEQ ID №: 269)

Группа 4

MQSIQLPRT (SEQ ID №: 270)

Группа 5

QQANDFPIT (SEQ ID №: 271)

Группа 6

MQALQTPCS (SEQ ID №: 272)

Группа 7

QVWD G N SDHVV (SEQ ID №: 273)

QVWD N T SDHVV (SEQ ID №: 274)

QVWD S S SDHVV (SEQ ID №: 275)

QVWD X_1 X_2 SDHVV (SEQ ID №: 276)

где X_1 является G, S или N, и X_2 является S, T или N.

Группа 8

QQ C G S S P L T (SEQ ID №: 277)

QQ Y G G S P L T (SEQ ID №: 278)

QQ Y G S A P L T (SEQ ID №: 279)

QQ Y G S S F T (SEQ ID №: 280)

QQ Y G S S P L T (SEQ ID №: 281)

QQ S G S S P L T (SEQ ID №: 282)

QQ X_3 G X_4 X_5 X_6 X_7 T (SEQ ID №: 283)

где X_3 является C, Y или S, X_4 является S или G, X_5 является S или A, X_6 является P или F, и X_7 является L или отсутствует.

CDR2 легкой цепи

Группа 1

AASSLQS (SEQ ID №: 284)

Группа 2

GVSTRAT (SEQ ID №: 285)

Группа 3

DDSDRPS (SEQ ID №: 286)

Группа 4

EVSNRFS (SEQ ID №: 287)

Группа 5

L G S N R A S (SEQ ID №: 288)

L G S D R A S (SEQ ID №: 289)

L G S X_{27} R A S (SEQ ID №: 290)

где X_{27} является N или D.

Группа 6

G A S S RAT (SEQ ID №: 291)

G T S S RAT (SEQ ID №: 292)

G A S F RAT (SEQ ID №: 293)

G X_8 S X_{28} RAT (SEQ ID №: 294)

где X_8 является A или T, и X_{28} является S или F.

CDR1 легкой цепи

Группа 1

RASQSVNSNLA (SEQ ID №: 295)

Группа 2

RASQDIRYDLG (SEQ ID №: 296)

Группа 3

RASQGISIWLA (SEQ ID №: 297)

Группа 4

KSSQSLLQSDGKTYLY (SEQ ID №: 298)

Группа 5

RASQ N F D S S S LA (SEQ ID №: 299)

RASQ N F D S S Y LA (SEQ ID №: 300)

RASQ S V S G N Y LA (SEQ ID №: 301)

RASQ S V S G T Y LA (SEQ ID №: 302)

RASQ N F D S N Y LA (SEQ ID №: 303)

RASQ X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} LA (SEQ ID №: 304)

где X_9 является A или S, X_{10} является V или F, X_{11} является D или S, X_{12} является G или S, X_{13} является S, N или T, и X_{14} является S или Y.

Группа 6

GGNNIGS E SVH (SEQ ID №: 305)

GGNNIGS Q SVH (SEQ ID №: 306)

GGNNIGS X_{15} SVH (SEQ ID №: 307)

где X_{15} является E или Q.

Группа 7

RSSQSLL Y Y NG F T Y LD (SEQ ID №: 308)

RSSQSLL H S NG Y N F LD (SEQ ID №: 309)

RSSQSLL X_{29} X_{30} NG X_{31} X_{32} X_{33} LD (SEQ ID №: 310)

где X_{29} является Y или H, X_{30} является Y или S, X_{31} является F или Y, X_{32} является T или N, и X_{33} является Y или F.

CDR3 тяжелой цепи

Группа 1

IVVVPAAIQSYYYYYGMGV (SEQ ID №: 311)

Группа 2

DPDGDYYYYGMDV (SEQ ID №: 312)

Группа 3

TYSSGWYVWDYYGMDV (SEQ ID №: 313)

Группа 4

DRVLSYYAMAV (SEQ ID №: 314)

Группа 5

VRIAGDYYYYYGMDV (SEQ ID №: 315)

Группа 6

ENIVVIPAAIFAGWFDP (SEQ ID №: 316)

Группа 7

DRAAAGLHYYYGMDV (SEQ ID №: 317)

Группа 8

I L L L G A YYY Y GMDV (SEQ ID №: 318)

I L L V G A YYY C GMDV (SEQ ID №: 319)

V V T G G YYY D GMDV (SEQ ID №: 320)

S V V T G G YYY D GMDV (SEQ ID №: 321)

X_{34} X_{16} X_{17} X_{18} G X_{19} YYY X_{20} GMDV (SEQ ID №: 322)

где X_{34} является I, V или S, X_{16} является L или V, X_{17} является L, T или V, X_{18} является L, V, G или T, X_{19} является A, G или отсутствует, и X_{20} является Y, C или D.

Группа 9

SLIVV I VY A LD H (SEQ ID №: 323)

SLIVV I VY A LD Y (SEQ ID №: 324)

SLIVV M VY V LD Y (SEQ ID №: 325)

SLIVV X_{21} VY X_{22} LD X_{23} (SEQ ID №: 326)

где X_{21} является I или M, X_{22} является A или V, и X_{23} является H или Y.

CDR2 тяжелой цепи

Группа 1

GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID №: 327)

Группа 2

RIKSK T DGGTTDYAAPVKG (SEQ ID №: 328)

RIKSK DGGTTDYAAPVKG (SEQ ID №: 330)

RIKSK X_{42} DGGTTDYAAPVKG (SEQ ID №: 483)

где X_{42} является T или отсутствует.

Группа 3

HIFSNDEKSYSTSLK S (SEQ ID №: 331)

HIFSNDEKSYSTSLK N (SEQ ID №: 332)

HIFSNDEKSYSTSLK **X_{24}** (SEQ ID №: 333)

где X_{24} является S или N.

Группа 4

G ISGSGVST H YADSVKG (SEQ ID №: 334)

G ISGSGVST Y YADSVKG (SEQ ID №: 335)

A ISGSGVST Y YADSVKG (SEQ ID №: 336)

A ISGSGVST N YADSVKG (SEQ ID №: 337)

X_{25} ISGSGVST X_{26} YADSVKG (SEQ ID №: 338)

где X_{25} является G или A, и X_{26} является H, Y или N.

Группа 5

VIWYDGS D KYY A DSVKG (SEQ ID №: 339)

VIWYDGS I KYY G DSVKG (SEQ ID №: 340)

VIWYDGS X_{35} KYY X_{36} DSVKG (SEQ ID №: 341)

где X_{35} является D или I, и X_{36} является A или G.

Группа 6

N IY Y SGST Y YNPSLKS (SEQ ID №: 342)

R IY T SGST Y YNPSLKS (SEQ ID №: 343)

R IY T SGST N YNPSLKS (SEQ ID №: 329)

X_{37} IY X_{38} SGST X_{41} YNPSLKS (SEQ ID №: 344)

где X_{37} является N или R, X_{38} является Y или T, и X_{41} является Y или N.

CDR1 тяжелой цепи

Группа 1

DLSMH (SEQ ID №: 345)

Группа 2

DAWMS (SEQ ID №: 346)

Группа 3

TYAMS (SEQ ID №: 347)

Группа 4

SYFWS (SEQ ID №: 348)

Группа 5

SGGYNWS (SEQ ID №: 349)

Группа 6

NARMGV S (SEQ ID №: 350)

NARMGV N (SEQ ID №: 351)

NARMGV **X_{39}** (SEQ ID №: 352)

где X_{39} является S или N.

Группа 7

S YGIH (SEQ ID №: 353)

N YGIH (SEQ ID №: 354)

X_{40} **YGIH** (SEQ ID №: 355)

где X_{40} является S или N.

В некоторых случаях антиген-связывающий белок содержит по меньшей мере одну область CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи, имеющую одну из вышеперечисленных консенсусных последовательностей. В некоторых случаях антиген-связывающий белок содержит по меньшей мере одну область CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи, имеющую одну из вышеперечисленных консенсусных последовательностей. В других случаях антиген-связывающий белок содержит по меньшей мере две области CDR тяжелой цепи, соответствующие вышеперечисленным консенсусным последовательностям, и/или по меньшей мере две области CDR легкой цепи, соответствующие вышеперечисленным консенсусным последовательностям. В других дополнительных случаях антиген-

связывающий белок содержит по меньшей мере три области CDR тяжелой цепи, соответствующие вышеперечисленным консенсусным последовательностям, и/или по меньшей мере три области CDR легкой цепи, соответствующие вышеперечисленным консенсусным последовательностям.

Примеры антиген-связывающих белков

Согласно одному аспекту изолированный антиген-связывающий белок содержит (а) одну или несколько областей, определяющих комплементарность, тяжелой цепи (CDRH), выбранных из группы, состоящей из: (i) области CDRH1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 121-131; (ii) области CDRH2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 132-144; (iii) области CDRH3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 145-157; и (iv) области CDRH по пп. (i), (ii) и (iii), которая содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам; (б) одну или несколько областей, определяющих комплементарность, легкой цепи (CDRL), выбранных из группы, состоящей из: (i) области CDRL1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 158-170; (ii) области CDRL2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 171-179; (iii) области CDRL3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 180-194; и (iv) области CDRL по пп. (i), (ii) и (iii), которая содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по не более чем пяти, четырем, трем, двум или одной аминокислоте; или (в) одну или более областей тяжелой цепи CDRH по п. (а) и одну или более областей CDRL легкой цепи по п. (б).

В другом варианте воплощения области CDRH обладают по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 121-157, и/или области CDRL обладают по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью

последовательности относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 158-194. В еще одном варианте воплощения VH выбран из группы, состоящей из SEQ ID №: 121-157, и/или VL выбран из группы, состоящей из SEQ ID №: 158-194.

Согласно одному аспекту изолированный антиген-связывающий белок содержит (а) одну или несколько вариабельных областей тяжелой цепи (VH), выбранных из группы, состоящей из: (i) SEQ ID №: 121-157; и (ii) области VH по п. (i), которая содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по не более чем пяти, четырем, трем, двум или одной аминокислоте; (б) одну или несколько вариабельных областей легкой цепи (VL), выбранных из группы, состоящей из: (i) SEQ ID №: 158-194, и (ii) области VL по п. (i), которая содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по не более чем пяти, четырем, трем, двум или одной аминокислоте; или (в) одну или несколько вариабельных областей тяжелой цепи по п. (а) и одну или несколько вариабельных областей легкой цепи по п. (б).

В другом варианте воплощения вариабельные области тяжелой цепи (VH) обладают по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 121-157, и/или вариабельные области легкой цепи (VL) обладают по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 158-194.

Согласно одному аспекту предложен антиген-связывающий белок, который специфично связывается с эпитопом, содержащим один или более аминокислотных остатков из FGFR1c, FGRF2c, FGFR3c и FGFR4.

Согласно еще одному аспекту также предложен антиген-связывающий белок, который специфично связывается с эпитопом, содержащим один или более аминокислотных остатков из β-Клото.

Согласно еще одному аспекту также предложен антиген-связывающий белок, который специфично связывается с эпитопом, содержащим один или более аминокислотных остатков из β-Клото и один или более аминокислотных остатков из FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4.

В другом варианте воплощения изолированный антиген-связывающий белок, описанный выше, содержит первую аминокислотную последовательность, включающую по меньшей мере одну из консенсусных последовательностей CDRH, раскрытых здесь, и вторую аминокислотную последовательность, включающую по меньшей мере одну из консенсусных последовательностей CDRL, раскрытых здесь.

По одному аспекту изобретения первая аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере две из консенсусных последовательностей CDRH, и/или вторая аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере две из консенсусных последовательностей CDRL. В некоторых вариантах воплощения первая и вторая аминокислотные последовательности ковалентно связаны друг с другом.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 146, CDRH2 с SEQ ID №: 133 и CDRH1 с SEQ ID №: 122, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 190, CDRL2 с SEQ ID №: 176 и CDRL1 с SEQ ID №: 167.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 147, CDRH2 с SEQ ID №: 133 и CDRH1 с SEQ ID №: 122, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка

содержит CDRL3 с SEQ ID №: 189, CDRL2 с SEQ ID №: 176 и CDRL1 с SEQ ID №: 167.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 148, CDRH2 с SEQ ID №: 133 и CDRH1 с SEQ ID №: 122, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 188, CDRL2 с SEQ ID №: 176 и CDRL1 с SEQ ID №: 166.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 148, CDRH2 с SEQ ID №: 134 и CDRH1 с SEQ ID №: 122, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 188, CDRL2 с SEQ ID №: 176 и CDRL1 с SEQ ID №: 166.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 150, CDRH2 с SEQ ID №: 136 и CDRH1 с SEQ ID №: 124, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 183, CDRL2 с SEQ ID №: 174 и CDRL1 с SEQ ID №: 161.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 152, CDRH2 с SEQ ID №: 138 и CDRH1 с SEQ ID №: 124, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 184, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 162.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 152, CDRH2 с SEQ ID №: 139 и CDRH1 с SEQ ID №: 124, и/или вторая аминокислотная

последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 186, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 162.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 151, CDRH2 с SEQ ID №: 137 и CDRH1 с SEQ ID №: 124, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 186, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 164.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 151, CDRH2 с SEQ ID №: 137 и CDRH1 с SEQ ID №: 124, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 182, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 160.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 153, CDRH2 с SEQ ID №: 140 и CDRH1 с SEQ ID №: 131, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 185, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 163.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 153, CDRH2 с SEQ ID №: 140 и CDRH1 с SEQ ID №: 125, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 185, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 163.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 149, CDRH2 с SEQ ID №: 135 и CDRH1

с SEQ ID №: 123, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 181, CDRL2 с SEQ ID №: 172 и CDRL1 с SEQ ID №: 159.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 149, CDRH2 с SEQ ID №: 135 и CDRH1 с SEQ ID №: 123, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 187, CDRL2 с SEQ ID №: 175 и CDRL1 с SEQ ID №: 165.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 145, CDRH2 с SEQ ID №: 132 и CDRH1 с SEQ ID №: 121, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 180, CDRL2 с SEQ ID №: 171 и CDRL1 с SEQ ID №: 158.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 154, CDRH2 с SEQ ID №: 133 и CDRH1 с SEQ ID №: 126, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 191, CDRL2 с SEQ ID №: 171 и CDRL1 с SEQ ID №: 168.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 157, CDRH2 с SEQ ID №: 144 и CDRH1 с SEQ ID №: 130, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 192, CDRL2 с SEQ ID №: 177 и CDRL1 с SEQ ID №: 169.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка

содержит CDRH3 с SEQ ID №: 155, CDRH2 с SEQ ID №: 135 и CDRH1 с SEQ ID №: 127, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 193, CDRL2 с SEQ ID №: 178 и CDRL1 с SEQ ID №: 170.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 156, CDRH2 с SEQ ID №: 142 и CDRH1 с SEQ ID №: 129, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 194, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 163.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 156, CDRH2 с SEQ ID №: 141 и CDRH1 с SEQ ID №: 128, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 194, CDRL2 с SEQ ID №: 173 и CDRL1 с SEQ ID №: 163.

В дополнительном варианте воплощения первая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRH3 с SEQ ID №: 156, CDRH2 с SEQ ID №: 143 и CDRH1 с SEQ ID №: 128, и/или вторая аминокислотная последовательность изолированного антиген-связывающего белка содержит CDRL3 с SEQ ID №: 194, CDRL2 с SEQ ID №: 179 и CDRL1 с SEQ ID №: 163.

В дополнительном варианте воплощения антиген-связывающий белок содержит по меньшей мере две последовательности CDRH из последовательностей тяжелой цепи H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 или H18, как показано в таблице 4A. В другом дополнительном варианте воплощения антиген-связывающий белок содержит по меньшей мере две последовательности CDRL из последовательностей легкой цепи L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14,

L15, L16, L17 или L18, как показано в таблице 4B. В еще одном дополнительном варианте воплощения антиген-связывающий белок содержит по меньшей мере две последовательности CDRH из последовательностей тяжелой цепи H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 или H18, как показано в таблице 4A, и по меньшей мере две последовательности CDRL из последовательностей легкой цепи L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, L17 или L18, как показано в таблице 4B.

В еще одном варианте воплощения антиген-связывающий белок содержит последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из последовательностей тяжелой цепи H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 или H18, как показано в таблице 4A. В еще одном варианте воплощения антиген-связывающий белок содержит последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из последовательностей легкой цепи L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, L17 или L18, как показано в таблице 4B.

В еще одном варианте воплощения антиген-связывающий белок содержит все шесть последовательностей CDR из L1 и H1 или L2 и H2, или L3 и H3, или L3 и H4, или L4 и H5, или L5 и H6, или L6 и H7, или L7 и H8, или L8 и H7, или L9 и H9, или L9 и H10, или L10 и H11, или L11 и H11, или L12 и H12, или L13 и H13, или L14 и H14, или L15 и H15, или L16 и H16, или L17 и H17, или L18 и H18, как показано в таблицах 4A и 4B.

Таблица 4A- Последовательности тяжелых цепей

Ссылка	Полноразмерная тяжелая цепь (HN№)	SEQ ID № полноразмерной тяжелой цепи	Вариабельная область тяжелой цепи (VHN№)	SEQ ID № вариабельной области тяжелой цепи	CDRH1, SEQ ID №	CDRH2, SEQ ID №	CDRH3, SEQ ID №

17C3	H1	30	V_H1	66	122	133	146
22H5	H2	31	V_H2	67	122	133	147
16H7	H3	32	V_H3	68	122	133	148
24H11	H4	33	V_H4	69	122	134	148
18G1	H5	34	V_H5	70	124	136	150
17D8	H6	35	V_H6	71	124	138	152
26H11	H7	36	V_H7	72	124	139	152
12E4	H8	37	V_H8	73	124	137	151
12C11	H7	37	V_H8	73	124	137	151
21H2	H9	38	V_H9	74	131	140	153
21B4	H10	39	V_H10	75	125	140	153
18B11,1	H11	40	V_H11	76	123	135	149
18B11,2	H11	40	V_H11	77	123	135	149
20D4	H12	41	V_H12	78	121	132	145
46D11	H13	42	V_H13	79	126	133	154
40D2	H14	46	V_H14	80	130	144	157
39F7	H16	44	V_H16	82	129	142	156
39F11	H17	43	V_H17	83	128	141	156
37D3	H15	47	V_H15	81	127	135	155
39G5	H18	45	V_H18	84	128	143	156

Таблица 4B- Последовательности легких цепей

Ссылка	Полноразмерная легкая цепь (LN)	SEQ ID № полноразмерной легкой цепи	Вариабельная область легкой цепи (VHN)	SEQ ID № вариабельной области легкой цепи	CDRL1, SEQ ID №	CDRL2, SEQ ID №	CDRL3, SEQ ID №
17C3	L1	48	V_L1	85	167	176	190
22H5	L2	49	V_L2	86	167	176	189
16H7	L3	50	V_L3	87	166	176	188
24H11	L3	50	V_L3	87	166	176	188

18G1	L4	51	V_L4	88	161	174	183
17D8	L5	52	V_L5	89	162	173	184
26H11	L6	53	V_L6	90	162	173	186
12E4	L7	54	V_L7	91	164	173	186
12C11	L8	55	V_L8	92	160	173	182
21H2	L9	56	V_L9	93	163	173	185
21B4	L9	56	V_L9	93	163	173	185
18B11, 1	L10	57	V_L10	94	159	172	181
18B11, 2	L11	58	V_L11	95	165	175	187
20D4	L12	59	V_L12	96	158	171	180
46D11	L13	60	V_L13	97	168	171	191
40D2	L14	61	V_L14	98	169	177	192
39F7	L16	63	V_L16	100	163	173	194
37D3	L15	62	V_L15	99	170	178	193
39F11	L17	64	V_L17	101	163	173	194
39G5	L18	65	V_L18	102	163	179	194

По одному из аспектов изобретения изолированные антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, предложенные здесь, могут являться моноклональным антителом, поликлональным антителом, рекомбинантным антителом, антителом человека, гуманизированным антителом, химерным антителом, мультиспецифичным антителом или фрагментом этих антител.

В другом варианте воплощения фрагмент антитела изолированных антиген-связывающих белков, предложенных здесь, может являться Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, $F(ab')_2$-фрагментом, Fv-фрагментом, диателом или молекулой одноцепочечного антитела.

В дополнительном варианте воплощения изолированный антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-

Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, предложенный здесь, является антителом человека, которое может принадлежать к типу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В другом варианте воплощения изолированный антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, содержит полипептид легкой или тяжелой цепи, как указано в таблицах 1A-1B. В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, содержит вариабельный домен легкой цепи или вариабельный домен тяжелой цепи, такие, как перечисленные в таблицах 2A-2B. В других вариантах воплощения антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, содержит одну, две или три области CDRH или одну, две или три области CDRL, как указано в таблицах 3A-3B, 4A-4B и в таблице 6C, *см. ниже*. Такие антиген-связывающие белки, а фактически - любой из раскрытых здесь антиген-связывающих белков, могут быть пегилированы с участием одной или нескольких молекул ПЭГ, например, молекул ПЭГ, имеющих молекулярную массу, выбранную из группы, состоящей из 5000, 10000, 20000, 40000, 50000, 60000, 80000, 100000 или более 100000.

По еще одному аспекту любой антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, предложенный здесь, может быть соединен с группой маркирования и может

конкурировать за связывание внеклеточной части (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, с антиген-связывающим белком, являющимся одним из изолированных антиген-связывающих белков, предложенных здесь. В одном из вариантов воплощения изолированный антиген-связывающий белок, предложенный здесь, может уменьшать уровни глюкозы в крови, снижать уровни триглицеридов и холестерина или улучшать другие гликемические параметры и факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний при введении пациенту.

Понятно, что для любого антиген-связывающего белка, содержащего более чем одну область CDR, приведенную в таблицах 3A-3B и 4A-4B, может быть полезно любое сочетание областей CDR, независимо выбранных из приведенных последовательностей. Таким образом, могут быть получены антиген-связывающие белки с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью независимо выбранными областями CDR. Однако, как будет понятно специалисту в данной области техники, в конкретных вариантах воплощения в общем случае применяют сочетания областей CDR, которые не содержат повторений, *например,* антиген-связывающие белки в общем случае не получают с двумя областями CDRH2 и т.д.

Некоторые раскрытые здесь антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, более подробно обсуждаются далее.

Антиген-связывающие белки, а также эпитопы связывания и домены связывания

Когда говорят, что антиген-связывающий белок связывается с эпитопом на (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексе, содержащем β-Клото и одну из

молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, или с внеклеточным доменом β-Колото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, например, это означает, что антиген-связывающий белок специфично связывается с заданной частью (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В некоторых вариантах воплощения, *например,* в определенных случаях, когда антиген-связывающий белок связывается только с FGFR1c или β-Клото, антиген-связывающий белок может специфично связываться с полипептидом, состоящим из заданных остатков *(например,* заданных сегментов β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, таких как остатки, раскрытые в примере 14). В других вариантах воплощения, *например,* в определенных случаях, когда антиген-связывающий белок взаимодействует как с β-Клото, так и с одной или несколькими из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, антиген-связывающий белок может связываться с остатками, последовательностями остатков или областями как в составе β-Клото, так и в составе FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, в зависимости от того, какой рецептор распознается антиген-связывающим белком. В других вариантах воплощения антиген-связывающий белок будет связываться с остатками, последовательностью остатков или областями комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, например, FGFR1c.

В любом из вышеизложенных вариантов воплощения такой антиген-связывающий белок не должен обязательно образовывать контакт с каждым остатком в составе (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, и FGFR4, или внеклеточного домена указанных белков или комплексов. Также не обязательно каждая замена или делеция одной аминокислоты в составе (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, и FGFR4, или внеклеточного домена

указанных белков или комплексов, будет оказывать существенное влияние на аффинность связывания.

Специфичность к эпитопу и домен(ы) связывания антиген-связывающего белка можно определить с применением ряда способов. В некоторых способах, например, применяют укороченные молекулы антигена. В других способах применяют антиген, мутированный по одному или нескольким специфичным остаткам, например, с применением такого подхода как сканирование аланином или сканирование аргинином, или путем получения и исследования химерных белков, в которых произведен обмен различных доменов, областей или аминокислот между двумя белками *(например,* принадлежащими мыши и человеку формами одного или нескольких антигенов или целевых белков), или путем анализа защиты от действия протеаз.

Конкурирующие антиген-связывающие белки

Согласно одному аспекту предложены антиген-связывающие белки, которые конкурируют с одним из приведенных в качестве примера антител или функциональных фрагментов за связывание с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Такие антиген-связывающие белки также могут связываться с тем же эпитопом, что и один из приведенных здесь в качестве примера антиген-связывающих белков, или с частично совпадающим эпитопом. Предполагается, что антиген-связывающие белки и фрагменты, которые конкурируют с приведенными в качестве примера антиген-связывающими белками или связываются с тем же эпитопом, что и приведенные в качестве примера антиген-связывающие белки, демонстрируют схожие функциональные особенности. Приведенные в качестве примера антиген-связывающие белки и фрагменты включают таковые с тяжелыми и легкими цепями H1-H18 и L1-L18, доменами вариабельных областей V_L1-V_L18 и V_H1-V_H18 и областями CDR, предложенными здесь, включая области из таблиц 1, 2, 3 и 4.

Таким образом, в качестве конкретного примера воплощения, предложенные антиген-связывающие белки включают таковые, конкурирующие с антителом, содержащим:

(а) 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 из областей CDR, перечисленных для антитела, указанного в таблицах 3A и 3B, и 4A, и 4B, и в таблице 6C, *см. далее;*

(б) V_H и V_L, выбранные из V_L1-V_L18 и V_H1-V_H18 и перечисленные для антитела, указанного в таблицах 2A и 2B; или

(в) две легкие цепи и две тяжелые цепи, как указано для антитела, приведенного в таблицах 1A и 12B, и в таблице 6A, *см. далее.*

Таким образом, в одном из вариантов воплощения настоящее изобретение предлагает антиген-связывающие белки, которые конкурируют за связывание (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, с референсным антителом, при этом референсное антитело содержит сочетание последовательностей вариабельных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, выбранное из группы, состоящей из L1H1, L2H2, L3H3, L3H4, L4H5, L5H6, L6H7, L7H8, L8H8, L9H9, L9H10, L10H11, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17 или L18H18. В другом варианте воплощения настоящее изобретение предлагает антитела человека, которые конкурируют за связывание (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, с референсным антителом, при этом референсное антитело является 17C3, 22H5, 16H7, 24H11, 18G1, 17D8, 26H11, 12E4, 12C11, 21H2, 21B4, 18B11.1, 18B11.2, 20D4, 46D11, 40D2, 37D3, 39F7, 39F1 или 39G5.

В дополнительном варианте воплощения предложено изолированное антитело человека, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, в существенной степени с той же Kd, что и референсное

антитело; инициирует FGF21-подобный сигналлинг при ELK-люциферазном анализе *in vitro* в той же степени, что и референсное антитело; снижает уровень глюкозы в крови; снижает уровни липидов в сыворотке; и/или конкурирует с указанным референсным антителом за связывание с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, при этом референсное антитело выбрано из группы, состоящей из 17C3, 22H5, 16H7, 24H11, 18G1, 17D8, 26H11, 12E4, 12C11, 21H2, 21B4, 18B11.1, 18B11.2, 20D4, 46D11, 40D2, 37D3, 39F7, 39F1 или 39G5.

Способность конкурировать с антителом можно определить с применением любого пригодного способа анализа, такого, как описан в примере 8, при котором антиген-связывающие белки 17C3, 22H5, 16H7, 24H11, 18G1, 17D8, 26H11, 12E4, 12C11, 21H2, 21B4, 18B11.1, 18B11.2, 20D4, 46D11, 40D2, 37D3, 39F7, 39F1 или 39G5 могут применяться в качестве референсного антитела.

Моноклональные антитела

Предложенные антиген-связывающие белки включают моноклональные антитела, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и индуцируют FGF21-подобный сигналлинг в различной степени. Моноклональные антитела могут быть получены с применением любой методики, известной специалистам в данной области, *например,* с помощью иммортализации клеток селезенки, полученных от трансгенного животного после завершения схемы иммунизации. Клетки селезенки можно иммортализировать с применением любой методики, известной специалистам в данной области техники, *например,* путем их слияния с клетками миеломы для получения гибридомы. Клетки миеломы, которые пригодны для применения в методиках слияния с получением гибридомы, предпочтительно являются клетками, не продуцирующими антитела,

имеют высокую эффективность слияния и дефицитны по определенным ферментам, что делает их неспособными расти в некоторых селективных средах, поддерживающих рост только нужных слитых клеток (гибридом). Примеры клеточных линий, пригодных для применения для слияния в системе на основе клеток мыши, включают Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XXO Bul; примеры клеточных линий, применяемых для слияния в системе на основе клеток крысы включают R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210. Другими клеточными линиями, полезными для слияния клеток, являются U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

В некоторых случаях гибридомную клеточную линию получают путем иммунизации животного *(например,* трансгенного животного, содержащего последовательности иммуноглобулинов человека) иммуногеном FGFR1c, β-Клото или FGFR1c и/или β-Клото *(например,* растворимым комплексом, содержащим внеклеточные домены FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, и/или β-Клото, как показано в примерах 2 и 3; мембранами, на которых экспрессированы внеклеточные домены FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, и/или β-Клото, как показано в примерах 1 и 3; или целыми клетками, экспрессирующими FGFR1c и/или β-Клото, как показано в примерах 1 и 3); выделения клеток селезенки из иммунизированного животного; слияния выделенных клеток селезенки с линией клеток миеломы с получением гибридомных клеток; получения линии гибридомных клеток из гибридомных клеток и идентификации линии гибридомных клеток, которая продуцирует антитело, которое связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4 *(например,* как описано в примере 4), и может индуцировать FGF21-подобный сигналлинг *(например,* как описано в примерах 5-7). Такие линии гибридомных клеток и

продуцируемые ими моноклональные антитела формируют аспекты настоящего изобретения.

Моноклональные антитела, секретируемые линией гибридомных клеток, могут быть очищены с применением любой методики, известной специалистам в данной области техники. Гибридомы или моноклональные антитела могут быть дополнительно подвергнуты скринингу для идентификации моноклональных антител с определенными свойствами, такими как способность индуцировать FGF21-подобный сигналлинг. Примеры таких скрининговых исследований представлены здесь.

Химерные и гуманизированные антитела

Легко могут быть получены химерные и гуманизированные антитела на основе вышеупомянутых последовательностей. Одним из примеров является химерное антитело, которое представляет собой антитело, состоящее из белковых сегментов, происходящих из разных антител, которые ковалентно связаны с образованием функциональных легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина или их иммунологически функциональных частей. В общем случае часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности антител, происходящих от конкретного биологического вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как оставшаяся часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующей последовательности антител, происходящих от другого биологического вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител. Информацию по способам, относящимся к химерным антителам, *см.*, например, в патенте США № 4816567; и публикации Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, которые включены сюда в качестве ссылок. CDR-пересадка описана, например, в патентах США №№ 6180370, 5693762, 5693761, 5585089 и 5530101.

В общем случае целью получения химерного антитела является создание химерного белка, в котором максимизировано количество

аминокислот, соответствующих биологическому виду предполагаемого пациента/реципиента. Одним из примеров является антитело с "пересаженной областью CDR", которое содержит одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR), происходящих от конкретного биологического вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как оставшаяся часть цепи (цепей) антитела идентична или гомологична соответствующей последовательности антител, происходящих от другого биологического вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител. Для применения у человека вариабельную область или выбранные области CDR из антитела грызунов часто пересаживают в антитело человека, замещая вариабельные области или области CDR природного происхождения антитела человека.

Одним полезным типом химерного антитела является "гуманизированное" антитело. В общем случае гуманизированное антитело получают из моноклонального антитела, первоначально полученного от животного, не являющегося человеком. Определенные аминокислотные остатки в этом моноклональном антителе, в типичном случае - из частей антитела, не участвующих в узнавании антигена, модифицируют так, чтобы они были гомологичны соответствующим остаткам антитела человека соответствующего изотипа. Гуманизацию можно проводить, например, с применением различных способов для замещения по меньшей мере части вариабельной области антитела грызуна на соответствующие области антитела человека *см., например,* патенты США №№ 5585089 и 5693762; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536).

Согласно одному из аспектов изобретения области CDR вариабельных областей легких и тяжелых цепей антител, предложенных здесь *(например,* в таблицах 3 и 4) пересажены в каркасные области (FR) антител из того же или филогенетически отличающегося биологического вида. Например, области CDR

вариабельных областей легких и тяжелых цепей V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12, V_H13, V_H14, V_H15, V_H16, V_H17 или V_H18 и/или V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17 или V_L18 могут быть пересажены в консенсусные области FR антитела человека. Для создания консенсусных областей FR антитела человека можно выровнять области FR из нескольких аминокислотных последовательностей тяжелых цепей и легких цепей человека и идентифицировать консенсусную аминокислотную последовательность. В других вариантах воплощения области FR тяжелой или легкой цепи, раскрытые здесь, замещают областями FR из другой тяжелой цепи или легкой цепи. Согласно одному из аспектов изобретения редкие аминокислоты в областях FR тяжелой и легкой цепей антиген-связывающего белка *(например,* антитела), который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, не замещают, тогда как остальные аминокислоты в составе областей FR замещают. "Редкая аминокислота" – это специфичная аминокислота, которая находится в положении, в котором эта конкретная аминокислота в области FR обычно не обнаруживается. Альтернативно пересаженные вариабельные области одной тяжелой или легкой цепи могут применяться с консервативной областью, которая отличается от консервативной области этой конкретной тяжелой или легкой цепи, раскрытой здесь. В других вариантах воплощения пересаженные вариабельные области являются частью одноцепочечного антитела Fv.

В некоторых вариантах воплощения консервативные области из антител биологических видов, отличающихся от человека, могут применяться вместе с вариабельной областью (вариабельными областями) антител человека с получением гибридных антител.

Антитела, полностью принадлежащие человеку

Антитела, полностью принадлежащие человеку, также предложены в настоящем изобретении. Доступны способы получения полностью принадлежащих человеку антител, специфичных к данному антигену, без воздействия антигена на человека ("полностью принадлежащие человеку антитела"). Одним специфичным способом, предложенным для осуществления получения полностью принадлежащих человеку антител, является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Внедрение локусов иммуноглобулинов (Ig) человека в геном мыши, в котором были инактивированы эндогенные гены Ig, является одним из способов получения полностью принадлежащих человеку моноклональных антител (mAb) у мыши, животного, которое можно иммунизировать любым нужным антигеном. Применение полностью принадлежащих человеку антител может минимизировать иммуногенный и аллергический ответы, которые иногда могут быть вызваны введением человеку моноклональных антител мыши или происходящих от антител мыши в качестве терапевтических агентов.

Полностью принадлежащие человеку антитела могут быть получены путем иммунизации трансгенных животных (в типичном случае мышей), которые способны продуцировать спектр антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Антигены, применяемые для этой цели, в типичном случае содержат шесть или более непрерывно следующих аминокислот и, необязательно, конъюгированы с носителем, таким как гаптен. *См., например,* Jakobovits *et al.,* (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits *et al.,* (1993) *Nature* 362:255-258; и Bruggermann *et al.,* (1993) *Year in Immunol.* 7:33. В одном примере такого способа трансгенных животных получают, деактивируя у них эндогенные локусы иммуноглобулинов мыши, кодирующие тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов мыши, и вставляя в геном мыши крупные фрагменты геномной ДНК человека, содержащей локусы, которые кодируют белки тяжелых и легких цепей человека. Частично модифицированных животных, которые

содержат неполный набор локусов иммуноглобулинов человека, затем скрещивают для получения животного, содержащего все требуемые модификации иммунной системы. При введении им иммуногена эти трансгенные животные продуцируют антитела, которые являются иммуноспецифичными для иммуногена, но содержат в большей степени аминокислотные последовательности человека, а не мыши, включая вариабельные области. Более подробную информацию о таких способах *см., например,* в WO96/33735 и WO94/02602. Дополнительные способы, относящиеся к применению трансгенных мышей для получения антител человека, описаны в патентах США №№ 5545807; 6713610; 6673986; 6162963; 5545807; 6300129; 6255458; 5877397; 5874299 и 5545806; в публикациях PCT WO91/10741, WO90/04036 и в EP 546073B1, и EP 546073A1.

Трансгенные мыши, описанные выше, которые называются здесь мышами "HuMab", содержат минилокус генов иммуноглобулинов человека, кодирующий нереаранжированные последовательности тяжелых ([μ, мю] и [γ, гамма]) и легких [k, каппа] цепей иммуноглобулинов человека, вместе с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепей μ [мю] и k [каппа] (Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859). Соответственно, у мышей снижена экспрессия IgM или [к, каппа] мышей в ответ на иммунизацию, и внедренные трансгены тяжелых и легких цепей человека претерпевают переключение класса и соматические мутации с образованием высокоаффинных моноклональных антител IgG человека с [к, каппа] (Lonberg *et al., см. ранее;* Lonberg and Huszar, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding and Lonberg, (1995) *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546). Получение мышей HuMab подробно описано в публикациях Taylor *et al.*, (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.*, (1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuaillon *et al.*, (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, (1994) *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor *et al.*,

(1994) *International Immunology* 6:579-591; Lonberg and Huszar, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding and Lonberg, (1995) *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; вышеупомянутые публикации целиком включены сюда в качестве ссылок. *См.* дополнительно патенты США №№: 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; а также патент США № 5545807; международные публикации №№: WO 93/1227; WO 92/22646 и WO 92/03918, раскрытия которых целиком включены сюда в качестве ссылок. Технологии, применяемые для получения антител человека в этих трансгенных мышах также раскрыты в WO 98/24893 и публикации Mendez *et* al., (1997) *Nature Genetics* 15:146-156, которые включены сюда в качестве ссылок. Например, линии трансгенных мышей HCo7 и HCo12 могут применяться для получения антиген-связывающих белков *(например,* антител), которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и могут индуцировать FGF21-подобный сигналлинг. Дополнительные сведения, относящиеся к получению антител человека с помощью трансгенных мышей, представлены в примерах ниже.

При применении гибридомной технологии антиген-специфичные моноклональные антитела человека с требуемой специфичностью могут быть получены и выбраны от трансгенных мышей, таких, как описанные выше. Такие антитела можно клонировать и экспрессировать с применением пригодного вектора и клетки-хозяина, или антитела могут быть получены от культивируемых гибридомных клеток.

Полностью принадлежащие человеку антитела также можно получить из библиотек фагового дисплея (как описано в публикациях Hoogenboom *et al.*, (1991) *J. Mol. Biol.* 227:381 и Marks *et al.*, (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581). Методики фагового дисплея имитируют иммунный отбор посредством экспонирования спектров

антител на поверхности нитчатого бактериофага и последующего отбора фагов по их связыванию с выбранным антигеном. Одна такая методика описана в публикации PCT № WO 99/10494 (включенной сюда в качестве ссылки), где описано выделение высокоаффинных и функциональных агонистических антител к MPL- и msk-рецепторам с применением такого подхода.

Биспецифичные или бифункциональные антиген-связывающие белки

Также предложены биспецифичные и бифункциональные антитела, которые содержат одну или более областей CDR или одну или более вариабельных областей, как описано выше. Биспецифичное или бифункциональное антитело в некоторых случаях может являться искусственно созданным гибридным антителом, содержащим две различные пары тяжелой и легкой цепей и два различных сайта связывания. Биспецифичные антитела могут быть получены с применением различных способов, включая, но не ограничиваясь этим, слияние гибридом или сшивку Fab'-фрагментов. *См., например,* Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553. При связывании антиген-связывающего белка по настоящему изобретению с (i) β-Клото и одной или более молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (ii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, связывание может приводить к активации FGF21-подобной активности, согласно измерению с помощью анализа FGF21-подобной функции и сигналлинга, описанного в примерах 5-7; когда такой антиген-связывающий белок является антителом, его называют агонистическим антителом.

Различные другие формы

Некоторые антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, которые предложены в

настоящем изобретении, включают вариантные формы антиген-связывающих белков, описанных здесь *(например,* имеющих последовательности, перечисленные в таблицах 1-4).

В различных вариантах воплощения антиген-связывающие белки, раскрытые здесь, могут содержать одну или более аминокислот неприродного происхождения. Например, некоторые из антиген-связывающих белков содержат одну или более замен на аминокислоту неприродного происхождения в одной или более тяжелых или легких цепях, вариабельных областях или областях CDR, перечисленных в таблицах 1-4. Примеры аминокислот неприродного происхождения (которые могут заменять собой любые аминокислоты природного происхождения, обнаруженные в любой последовательности, раскрытой здесь, как описано) включают: 4-гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат, ε-N,N,N-триметиллизин, ε-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ-N-метиларгинин и другие схожие аминокислоты и иминокислоты *(например,* 4-гидроксипролин). При изображении полипептидов в этом документе слева расположен амино-конец, а справа – карбокси-конец, в соответствии с общепринятыми правилами обозначения. Неограничивающие списки примеров аминокислот неприродного происхождения, которые могут быть вставлены в последовательность антиген-связывающего белка или замещать остатки дикого типа в последовательности антиген-связывающего белка, включают β-аминокислоты, гомоаминокислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты, содержащие производные боковых цепей. Примеры включают (в L-форме или в D-форме; с аббревиатурами, как указано в скобках) следующие соединения: цитруллин (Cit), гомоцитруллин (hCit), Nα-метилцитруллин (NMeCit), Nα-метилгомоцитруллин (Nα-MeHoCit), орнитин (Orn), Nα-метилорнитин (Nα-MeOrn или NMeOrn), саркозин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hQ), Nα-метиларгинин (NMeR), Nα-метиллейцин (Nα-MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), Nα-метилглутамин

(NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновая кислота (Oic), 3-(l-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (IgI), пара-йодофенилаланин (pI-Phe), пара-аминофенилаланин (4AmP или 4-amino-Phe), 4-гуанидинофенилаланин (Guf), глициллизин (сокращенное название: "K(Nε-глицил)" или "K(глицил)", или "K(gly)"), нитрофенилаланин (nitrophe), аминофенилаланин (aminophe или Amino-Phe), бензилфенилаланин (benzylphe), γ-карбоксиглутаминовая кислота (γ-carboxyglu), гидроксипролин (hydroxypro), p-карбоксил-фенилаланин (Cpa), α-аминоадипиновая кислота (Aad), Nα-метил валин (NMeVal), N-α-метиллейцин (NMeLeu), Nα-метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклоцексилглицин (Chg), ацетиларгинин (acetylarg), α,β-диаминопропионовая кислота (Dpr), α,γ-диаминомасляная кислота (Dab), диаминопропионовая кислота (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метилфенилаланин (MePhe), β,β-дифенилаланин (BiPhA), аминомасляная кислота (Abu), 4-фенил-фенилаланин (или бифенилаланин, 4Bip), α-аминоизомасляная кислота (Aib), бета-аланин, бета-аминопропионовая кислота, пиперидиновая кислота, аминокапроновая кислота, аминогептановая кислота, аминопимелиновая кислота, десмозин, диаминопимелиновая кислота, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксилизин, алло-гидроксилизин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-метилвалин, 4-гидроксипролин (Hyp), γ-карбоксиглутамат, **ε**-N,N,N-триметиллизин, **ε**-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, ω-метиларгинин, 4-амино-O-фталевая кислота (4APA) и другие схожие аминокислоты и производные формы любых из специально перечисленных молекул.

Дополнительно антиген-связывающие белки могут содержать одну или более консервативных аминокислотных замен в одной или более тяжелых или легких цепях, вариабельных областях или

областях CDR, перечисленных в таблицах 1-4. Аминокислоты природного происхождения можно разделить на классы на основании общих свойств боковых цепей:

1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) кислотные: Asp, Glu;

4) основные: His, Lys, Arg;

5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и

6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Консервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другого члена того же самого класса. В консервативных аминокислотных заменах могут участвовать аминокислотные остатки неприродного происхождения, которые в типичном случае внедряют с помощью химического синтеза пептидов, а не синтеза в биологических системах. См. таблицу 5 *ниже*. Сюда относятся пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных остатков.

Неконсервативные замены могут включать замену члена одного из вышеперечисленных классов на члена другого класса. Такие замещенные остатки могут быть внедрены в области антитела, которые гомологичны антителам человека, или в негомологичные области молекулы.

При осуществлении таких замен, в соответствии с некоторыми вариантами воплощения, следует учитывать индекс гидрофобности аминокислот. Профиль гидрофобности белка вычисляют, устанавливая каждой аминокислоте числовое значение ("индекс гидрофобности") и затем последовательно усредняя эти значения, двигаясь вдоль пептидной цепи. Каждой аминокислоте присвоен индекс гидрофобности на основании ее свойств гидрофобности и заряда. Он составляет: изолейцин (+4,5), валин (+4,2), лейцин (+3,8), фенилаланин (+2,8), цистеин/цистин (+2,5), метионин (+1,9), аланин (+1,8), глицин (-0,4), треонин (-0,7), серин (-0,8), триптофан (-0,9), тирозин (-1,3), пролин (-1,6), гистидин (-3,2), глутаминовая кислота (-3,5), глутамин (-3,5),

аспарагиновая кислота (-3,5), аспарагин (-3,5), лизин (3,9) и аргинин (-4,5).

Важность профиля гидрофобности для придания белку биологической функции, включающей взаимодействия, понятна специалистам в данной области техники *(см., например,* Kyte *et al.,* 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-131). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты, имеющие схожий индекс гидрофобности или оценку гидрофобности, и при этом сохраняется схожая биологическая активность. При заменах на основе индекса гидрофобности в некоторых вариантах воплощения включена замена аминокислот, чьи индексы имеют значения в пределах ±2. В некоторых случаях включены замены с индексами в пределах ±1, а в других примерах включены замены с индексами в пределах ±0,5.

Также специалистам в данной области техники понятно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно произведена на основе гидрофильности, в частности, когда созданный таким образом биологически функциональный белок или пептид предполагают применять в иммунологических вариантах воплощения, как в данном случае. В некоторых вариантах воплощения самая высокая локальная средняя гидрофильность белка, обусловленная гидрофильностью расположенных рядом аминокислот, коррелирует с иммуногенностью и связыванием антигена или иммуногенностью, т.е. с биологическим свойством белка.

Этим аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0), лизин (+3,0), аспарагиновая кислота (+3,0±1), глутаминовая кислота (+3,0±1), серин (+0,3), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2), глицин (0), треонин (-0,4), пролин (-0,5±1), аланин (-0,5), гистидин (-0,5), цистеин (-1,0), метионин (-1,3), валин (-1,5), лейцин (-1,8), изолейцин (-1,8), тирозин (-2,3), фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При осуществлении изменений на основании схожих значений показателя гидрофильности в некоторых вариантах воплощения

включена замена аминокислот, чьи показатели гидрофильности имеют значения в пределах ±2, в других вариантах воплощения включены замены с показателями в пределах ±1, а в дополнительных вариантах воплощения включены замены с показателями в пределах ±0,5. В некоторых случаях также можно идентифицировать эпитопы по первичным аминокислотным последовательностям на основании гидрофильности. Эти области также называют "коровыми областями эпитопа".

Примеры консервативных аминокислотных замен представлены в таблице 5.

Таблица 5

Консервативные аминокислотные замены

Исходный остаток	Примеры замен
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Специалист в данной области техники сможет определить пригодные варианты полипептидов, которые указаны здесь, применяя хорошо известные методики совместно с информацией, предоставленной в этом документе. Специалист в данной области может идентифицировать пригодные области молекулы, которые можно заменить без нарушения активности, выбирая в качестве цели области, которые, как полагают, не являются важными для активности. Специалист в данной области техники также сможет идентифицировать остатки и части молекул, которые являются консервативными у схожих полипептидов. В дополнительных вариантах воплощения даже те области, которые могут быть важны для биологической активности или для структуры, могут быть подвергнуты консервативным аминокислотным заменам без нарушения биологической активности или без нежелательного воздействия на структуру полипептида.

Кроме этого, специалист в данной области техники может провести обзор структурно-функциональных исследований по идентификации остатков в схожих полипептидах, которые важны для активности или структуры. Принимая во внимание такое сравнение, можно предсказать важность аминокислотных остатков в белке, которые соответствуют аминокислотным остаткам, важным для активности или структуры в схожих белках. Специалист в данной области техники может выбрать химически схожие аминокислотные замены для таких предсказанных важных аминокислотных остатков.

Специалист в данной области техники также может проанализировать пространственную структуру и аминокислотную последовательность в сравнении со структурой схожих полипептидов. Принимая во внимание такую информацию, специалист в данной области техники может предсказать выравнивание аминокислотных остатков антитела относительно этой пространственной структуры. Специалист в данной области техники может решить не производить радикальных изменений

аминокислотных остатков, для которых предсказано расположение на поверхности белка, так как такие остатки могут быть вовлечены в важные взаимодействия с другими молекулами. Более того, специалист в данной области техники может получить тестовые варианты, содержащие единичную аминокислотную замену по каждому требуемому аминокислотному остатку. После этого может быть проведен скрининг этих вариантов с применением способов анализа FGF21-подобного сигналлинга *(см.* примеры, приведенные здесь), и, таким образом, получена информация относительно того, какие аминокислоты могут быть изменены, а какие изменять нельзя. Иными словами, на основании информации, полученной в таких стандартных экспериментах, специалист в данной области техники легко может определить положения аминокислот, в которых далее необходимо избегать замен самих по себе или в сочетании с другими мутациями.

Предсказанию вторичной структуры был посвящен ряд научных публикаций. *См.* Moult, (1996) *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou *et al.*, (1974) *Biochem.* 13:222-245; Chou *et al.*, (1974) *Biochemistry* 113:211-222; Chou *et al.*, (1978) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou *et al.*, (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, (1979) *Biophys. J.* 26:367-384. Более того, в настоящее время доступны компьютерные программы, помогающие предсказывать вторичную структуру. Один способ предсказания вторичной структуры основан на гомологичном моделировании. Например, два полипептида или белка, которые обладают идентичностью последовательностей более чем 30% или схожи более чем на 40% могут иметь схожие структурные топологии. Рост количества информации в базе данных по структуре белков (PDB) обеспечил повышение способности предсказывать вторичную структуру, в том числе потенциальное количество укладок в структуре, полипептида или белка. *См.* Holm *et al.*, (1999) *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247. Было высказано предположение (Brenner *et al.*, (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376), что

существует ограниченное число укладок в составе данного полипептида или белка, и как только будет достигнуто критическое количество разрешенных структур, предсказание структуры станет намного более точным.

Дополнительные способы предсказания вторичной структуры включают "способ протягивания" (Jones, (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-387; Sippl *et al.*, (1996) *Structure* 4:15-19), "анализ профилей" (Bowie *et al.*, (1991) *Science* 253:164-170; Gribskov *et al.*, (1990) *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov *et al.*, (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358) и "эволюционное сцепление" *(см.* Holm, (1999) *выше;* и Brenner, (1997) *выше).*

В некоторых вариантах воплощения осуществляются аминокислотные замены, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) уменьшают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания при образовании белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания с лигандом или антигеном и/или (4) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких полипептидов. Например, в последовательности природного происхождения могут быть произведены единичные или множественные аминокислотные замены (в некоторых вариантах воплощения – консервативные аминокислотные замены). Замены могут быть произведены в той части антитела, которая расположена вне домена (доменов), образующего межмолекулярные контакты. В таких вариантах воплощения могут применяться консервативные аминокислотные замены, которые не изменяют в существенной степени структурные характеристики исходной последовательности *(например,* одна или более аминокислотных замен, которые не нарушают вторичную структуру, характерную для исходного или нативного антиген-связывающего белка). Примеры принятых в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в публикациях *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company;

Introduction to Protein Structure (Branden and Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; and Thornton *et al.*, (1991) *Nature* 354:105, которые включены сюда в качестве ссылок.

Дополнительные предпочтительные варианты антител включают цистеиновые варианты, где один или более остатков цистеина в исходной или нативной аминокислотной последовательности делетированы или заменены другой аминокислотой *(например,* серином). Цистеиновые варианты полезны, *среди прочего,* когда антитела необходимо подвергнуть повторному фолдингу для принятия биологически активной конформации. Цистеиновые варианты могут содержать меньше остатков цистеина, чем нативное антитело, и в типичном случае содержат четное число для минимизации взаимодействий, обусловленных наличием неспаренных цистеинов.

Тяжелые и легкие цепи, домены вариабельных областей и области CDR, которые раскрыты, могут применяться для получения полипептидов, содержащих антиген-связывающую область, которая способна специфично связываться с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и может индуцировать FGF21-подобный сигналлинг. Например, одна или несколько областей CDR, перечисленных в таблицах 3 и 4, могут быть внедрены в молекулу *(например,* полипептид) ковалентно или нековалентно с образованием иммуноадгезивной молекулы. Иммуноадгезивная молекула может содержать область(и) CDR как часть более длинной полипептидной цепи, в ней область(и) CDR может(гут) быть ковалентно присоединена(ы) к другой полипептидной цепи, или область(и) CDR может(гут) быть присоединена(ы) нековалентно. Область (области) CDR придает(ют) иммуноадгезивной молекуле способность специфично связываться с конкретным представляющим интерес антигеном *(например,* (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул

FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, или расположенным на них эпитопом).

Тяжелые и легкие цепи, домены вариабельных областей и области CDR, которые раскрыты, могут применяться для получения полипептидов, содержащих антиген-связывающую область, которая способна специфично связываться с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и может индуцировать FGF21-подобный сигналлинг. Например, одна или несколько областей CDR, перечисленных в таблицах 3 и 4, могут быть внедрены в молекулу *(например,* полипептид), которая структурно схожа с "половиной" антитела, содержащей тяжелую цепь, легкую цепь антиген-связывающего белка, соединенные с Fc-фрагментом таким образом, что антиген-связывающий белок является моновалентным (подобно Fab-фрагменту), но содержит димерный Fc-фрагмент.

Также предложены миметики *(например,* "пептидные миметики" или "пептидомиметики") на основе доменов вариабельных областей и областей CDR, которые описаны здесь. Эти аналоги могут являться пептидами, непептидными молекулами или сочетаниями пептидных и непептидных областей. Fauchere, 1986, *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber and Freidinger, 1985, *TINS* p. 392; и Evans *et al.*, 1987, *J. Med. Chem.* 30:1229, которые включены сюда в качестве ссылок. Пептидомиметики, которые структурно схожи с терапевтически полезными пептидами, могут применяться для получения схожего терапевтического или профилактического эффекта. Такие соединения часто разрабатывают с помощью компьютерного молекулярного моделирования. В общем случае пептидомиметики являются белками, которые структурно схожи с антителом, демонстрирующим требуемую биологическую активность, такую как, в данном случае, способность специфично связываться с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, но, необязательно, содержат одну или

более замен пептидной связи на связывающие группировки, выбранные из: $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, -CH-CH-(цис- и транс-), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ и $-CH_2SO-$, произведенные способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Систематическая замена одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности на D-аминокислоту того же типа *(например,* вставка D-лизина вместо L-лизина) может применяться в некоторых вариантах воплощения для получения более стабильных белков. Кроме того, пептиды с ограниченной конформационной свободой, содержащие консенсусную последовательность или в существенной степени идентичный консенсусной последовательности вариант, могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники (Rizo and Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387, содержание которой включено сюда в качестве ссылки), например, путем добавления внутренних цистеиновых остатков, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, с помощью которых происходит циклизация пептида.

Также предложены производные раскрытых здесь антиген-связывающих белков, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Производные антиген-связывающие белки могут содержать любую молекулу или субстанцию, которая придает требуемое свойство антителу или фрагменту, такое как увеличенный период полувыведения при конкретном применении. Производный антиген-связывающий белок может содержать, например, детектируемый (или маркирующий) фрагмент *(например,* радиоактивную, колориметрическую, антигенную или ферментативную молекулу, детектируемый шарик (такой как магнитный или электроннoплотный *(например,* золотой) шарик), или молекулу, которая связывается с другой молекулой *(например,* биотин или стрептавидин)), терапевтический или диагностический фрагмент *(например,* радиоактивный,

цитотоксический или фармацевтически активный фрагмент), или молекулу, которая повышает пригодность антиген-связывающего белка для конкретного применения (*например,* для введения субъекту, такому как человек, или других применений *in vivo* или *in vitro*). Примеры молекул, которые могут применяться для получения производных антиген-связывающих белков включают альбумин (*например,* сывороточный альбумин человека) и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Сшитые с альбумином и пегилированные производные антиген-связывающих белков можно приготовить с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Некоторые антиген-связывающие белки включают полипептиды с пегилированными боковыми цепочками, как описано здесь. В одном из вариантов воплощения антиген-связывающий белок конъюгирован или иным способом связан с транстиретином (TTR) или вариантом TTR. TTR или вариант TTR может быть химически модифицирован, например, с применением химического соединения, выбранного из группы, состоящей из декстрана, поли(n-винилпирролидона), полиэтиленгликолей, гомополимеров пропропиленгликоля, со-полимеров полипропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированных полиолов и поливиниловых спиртов.

Другие производные включают ковалентные или агрегированные конъюгаты антиген-связывающих белков, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, которые раскрыты здесь, с другими белками или полипептидами, таких белков как полученные с помощью экспрессии рекомбинантные химерные белки, содержащие гетерологичные полипептиды, сшитые с N-концом или C-концом антиген-связывающего белка, который индуцирует FGF21-подобный сигналлинг. Например, конъюгированный пептид может представлять собой гетерологичный сигнальный (или лидерный) полипептид, *например,* лидерный пептид альфа-фактора дрожжей или пептид в виде выступающей в роли эпитопа маркера.

Содержащий антиген-связывающий белок химерный белок по настоящему изобретению может содержать пептиды, добавленные для облегчения процесса очистки или идентификации антиген-связывающего белка, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4 *(например,* маркер поли-His), и может индуцировать FGF21-подобный сигналлинг. Антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, также может быть связан с FLAG-пептидом, как описано в публикации Hopp *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6:1204; и патенте США № 5011912. FLAG-пептид является высоко антигенным и представляет собой эпитоп, обратимо связываемый специфичным моноклональным антителом, что делает возможным проведение быстрого анализа и простой очистки экспрессированного рекомбинантного белка. Реагенты, полезные для приготовления химерных белков, в которых FLAG-пептид сшит с данным полипептидом, имеются в продаже (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США).

Мультимеры, которые содержат один или более антиген-связывающих белков, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, составляют другой аспект настоящего изобретения. Мультимеры могут образовывать ковалентно связанные или нековалентно связанные димеры, тримеры или мультимеры более высокого порядка. Мультимеры, содержащие два или более антиген-связывающих белков, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и которые могут индуцировать FGF21-подобный сигналлинг, рассматриваются также как полезные для

терапевтических, диагностических и других применений, при этом одним из примеров такого мультимера является гомодимер. Другие примеры мультимеров включают гетеродимеры, гомотримеры, гетеротримеры, гомотетрамеры, гетеротетрамеры и т.д.

Один вариант воплощения относится к мультимерам, содержащим множественные антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и соединенным посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий между пептидными фрагментами, сшитыми с антиген-связывающим белком, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Такие пептиды могут являться пептидными линкерами (спейсерами) или пептидами, которые обладают способностью благоприятствовать мультимеризации. Лейциновые молнии и некоторые полипептиды, производные от антител, принадлежат к пептидам, которые могут способствовать мультимеризации присоединенных к ним антиген-связывающих белков, как более подробно описано здесь.

В некоторых вариантах воплощения мультимеры содержат от двух до четырех антиген-связывающих белков, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Части мультимера, являющиеся антиген-связывающими белками, могут являться любой из форм, описанных выше, *например,* вариантами или фрагментами. Предпочтительно мультимеры содержат антиген-связывающие белки, которые способны связываться с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4.

В одном из вариантов воплощения олигомер приготовлен с применением полипептидов, производных от иммуноглобулинов. Приготовление белков со сшивками, содержащих определенные

гетерологичные полипептиды, сшитые с различными частями производных от антител полипептидов (включая Fc-домен), было описано, *например,* в публикациях Ashkenazi *et al.,* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535; Byrn *et al.,* (1990) *Nature* 344:677; и Hollenbaugh *et al.,* 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology,* Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11.

Один вариант воплощения включает димер, содержащий два белка со сшивками, созданных путем сшивки антиген-связывающего белка, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, с Fc-областью антитела. Димер может быть получен, например, путем вставки гена со сшивками, кодирующего белок со сшивками, в подходящий экспрессионный вектор; экспрессией гена со сшивками в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным экспрессионным вектором; и путем создания условий для сборки экспрессированного белка со сшивками в молекулы, в основном схожие с антителами, после чего между Fc-фрагментами формируются межцепочечные дисульфидные связи с образованием димера.

Термин "Fc-полипептид" при использовании в этом документе включает нативные и мутантные формы полипептидов, производных от Fc-области антитела. Также включены укороченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирную область, которая способствует димеризации. Белки со сшивками, содержащие Fc-фрагменты (и образованные из них олигомеры) обеспечивают преимущество, позволяя облегчить процесс очистки с применением аффинной хроматографии на колонках с белком A или белком G.

Один пригодный Fc-полипептид, описанный в заявке PCT WO 93/10151 и патентах США №№ 5426048 и 5262522, является одноцепочечным полипептидом, охватывающим область от N-концевой шарнирной области до нативного C-конца области Fc антитела IgG1 человека. Еще один полезный Fc-полипептид

является мутантным Fc, описанным в патенте США № 5457035 и в публикации Baum *et al.*, (1994) *EMBO J.* 13:3992-4001. Аминокислотная последовательность этой мутантной формы идентична нативной последовательности Fc, представленной в WO 93/10151, за исключением того, что аминокислота 19 была заменена с Leu на Ala, аминокислота 20 была заменена с Leu на Glu, и аминокислота 22 была заменена с Gly на Ala. Мутантная форма демонстрирует сниженную аффинность к рецепторам для Fc.

В других вариантах воплощения различные части тяжелых и/или легких цепей антиген-связывающего белка, такого как раскрытый в этом документе, могут быть заменены на различные части тяжелой и/или легкой цепи антитела.

Альтернативно олигомер является белком со сшивками, содержащим множество антиген-связывающих белков, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, с пептидными линкерами (спейсерными пептидами) или без них. К пригодным пептидным линкерам относятся таковые, описанные в патентах США №№ 4751180 и 4935233.

Еще один способ приготовления олигомерных производных, содержащих антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, включает применение лейциновой молнии. Домены лейциновой молнии – это пептиды, которые обеспечивают олигомеризацию белков, в которых они находятся. Первоначально лейциновые молнии были идентифицированы в некоторых ДНК-связывающих белках (Landschulz *et al.*, (1988) *Science* 240:1759), и с тех пор были обнаружены в целом ряде различных белков. К известным лейциновым молниям относятся пептиды природного происхождения и их производные, которые могут димеризоваться и тримеризоваться. Примеры доменов лейциновой молнии, пригодных

для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке PCT WO 94/10308, а лейциновая молния, производная от белка D сурфактанта легких (SPD), описана в публикации Hoppe *et al.*, (1994) *FEBS Letters* 344:191, которые включены сюда в качестве ссылок. Применение модифицированной лейциновой молнии, которая способствует стабильной тримеризации гетерологичного белка, сшитого с ней, описано в публикации Fanslow *et al.*, (1994) *Semin. Immunol.* 6:267-278. В соответствии с одним из подходов рекомбинантные химерные белки, содержащие фрагмент или производное антиген-связывающего белка, который специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, сшит с пептидом лейциновой молнии и экспрессируется в пригодных клетках-хозяевах, а образующиеся растворимые олигомеры фрагментов или производных антиген-связывающего белка извлекают из супернатанта клеточной культуры.

В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающий белок обладает K_D (аффинностью связывания в равновесном состоянии) менее чем 1 пМ, 10 пМ, 100 пМ, 1 нМ, 2 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ или 50 нМ.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение направлено на создание антиген-связывающего белка, обладающего периодом полувыведения, равным по меньшей мере одному дню *in vitro* или *in vivo* (*например,* при введении субъекту, являющемуся человеком). В одном из вариантов воплощения антиген-связывающий белок обладает периодом полувыведения, равным по меньшей мере трем дням. В другом варианте воплощения антитело или его часть обладает периодом полувыведения, равным четырем дням или более. В другом варианте воплощения антитело или его часть обладает периодом полувыведения, равным восьми или более. В другом варианте воплощения антитело или его часть обладает периодом полувыведения, равным десяти дням или более. В другом варианте воплощения антитело или его часть обладает

периодом полувыведения, равным одиннадцати дням или более. В другом варианте воплощения антитело или его часть обладает периодом полувыведения, равным пятнадцати дням или более. В другом варианте воплощения антитело или его антиген-связывающая часть дериватизирована или модифицирована таким образом, что она обладает более продолжительным периодом полувыведения по сравнению с недериватизированным или немодифицированным антителом. В другом варианте воплощения антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, содержит точечные мутации, увеличивающие период полувыведения из сыворотки, как описано в WO 00/09560, опубликованной 24 февраля 2000 г., содержание которой включено сюда в качестве ссылки.

Гликозилирование

Антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, может иметь характер гликозилирования, отличающийся или измененный относительно обнаруживаемого в нативных формах. Как известно специалистам в данной области техники, характер гликозилирования может зависеть как от последовательности белка *(например,* присутствия или отсутствия определенных пригодных для гликозилирования аминокислотных остатков, как обсуждается ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в которых белок продуцируется. Конкретные примеры экспрессионных систем обсуждаются далее.

Гликозилирование белков в типичном случае является либо N-гликозилированием, либо O-гликозилированием. N-гликозилированием называют присоединение углеводного фрагмента к боковой цепочке аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин,

где X - это любая аминокислота, кроме пролина, служат последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепочке аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-гликозилированием называют присоединение одного из сахаров - N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы - к гидроксиаминокислоте, обычно - к серину или треонину, хотя также могут использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования в состав антиген-связывающего белка обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-гликозилирования). Изменения также могут быть произведены путем добавления одного или нескольких остатков серина или треонина или замены на них других аминокислотных остатков в исходной последовательности (в случае сайтов O-гликозилирования). Для упрощения процедуры аминокислотную последовательность антиген-связывающего белка можно изменять посредством изменений на уровне ДНК, в частности, путем внесения мутаций в ДНК, кодирующую целевой полипептид, по заранее выбранным основаниям, таким образом, чтобы образовывались кодоны, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

Еще одним способом увеличения количества углеводных фрагментов на антиген-связывающем белке является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к белку. Преимущество этих методик заключается в том, что они не требуют продукции белка в клетке-хозяине, обладающей способностью к N- и O-гликозилированию. В зависимости от применяемого способа присоединения сахар(а) может присоединяться к (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (в) свободным

сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (г) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (д) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан, или (е) к амидогруппе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330 и в публикации Aplin and Wriston, (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходном антиген-связывающем белке, может осуществляться химически или ферментативно. Для химического дегликозилирования необходимо воздействие на белок соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. В результате этой обработки происходит отщепление большей части или всех сахаров, за исключением соединительного сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в публикациях Hakimuddin *et al.*, (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 и Edge *et al.*, (1981) *Anal. Biochem.* 118:131. Ферментативное отщепление углеводных фрагментов от полипептидов может быть достигнуто с помощью применения различных эндо- и экзо-гликозидаз, как описано в публикации Thotakura *et al.*, (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350. Гликозилирование по потенциальным сайтам гликозилирования можно предотвратить путем применения соединения туникамицин, как описано в публикации Duskin *et al.*, (1982) *J. Biol. Chem.* 257:3105. Туникамицин блокирует образование связей белок-N-гликозид.

Следовательно, аспекты настоящего изобретения включают варианты гликозилирования антиген-связывающих белков, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, где количество и/или тип сайта (сайтов) гликозилирования были изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями исходного

полипептида. В некоторых вариантах воплощения белковые варианты антител включают большее или меньшее количество сайтов N-гликозилирования, чем нативное антитело. Сайты N-гликозилирования имеют характерную последовательность: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где аминокислотный остаток, обозначенный как X, может быть любым аминокислотным остатком, кроме пролина. Замена аминокислотных остатков с созданием этой последовательности обеспечивает потенциальный новый сайт для добавления N-присоединенной углеводной цепочки. Альтернативно замены, которые уничтожают или изменяют эту последовательность, будут предотвращать добавление N-присоединенной углеводной цепочки, присутствующей в нативном полипептиде. Например, уровень гликозилирования можно снизить с помощью делеции Asn или путем замены Asn на другую аминокислоту. В других вариантах воплощения создают один или несколько новых сайтов N-гликозилирования. Антитела в типичном случае содержат сайты N-гликозилирования в Fc-области.

Маркеры и эффекторные группы

В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, содержит один или несколько маркеров. Термин "маркирующая группа" или "маркер" означает любую детектируемую маркер. Примеры пригодных маркирующих групп включают, но не ограничиваются этим, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (*например,* ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), флуоресцентные группы (*например,* FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантаноидов), ферментативные группы (*например,* пероксидазу хрена, β-галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или заранее заданные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (*например,* пара последовательностей

лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные маркеры). В некоторых вариантах воплощения метящая группа соединена с антиген-связывающим белком через спейсерные фрагменты различной длины для уменьшения возможного стерического препятствия. Различные способы мечения белков известны специалистам в данной области техники и могут применяться, если это необходимо.

Термин "эффекторная группа" означает любую группу, присоединенную к антиген-связывающему белку, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и которая действует в качестве цитотоксического агента. Примерами пригодных эффекторных групп являются радиоизотопы или радионуклиды *(например,* ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I). Другие пригодные группы включают токсины, терапевтические группы или химиотерапевтические группы. Примеры пригодных групп включают калихимицин, ауристатин, гелданамицин и кантансин. В некоторых вариантах воплощения эффекторная группа соединена с антиген-связывающим белком через спейсерные фрагменты различной длины для уменьшения возможного стерического препятствия.

В общем случае маркеры подразделяют на различные классы, в зависимости от способа анализа, с помощью которого их детектируют: a) изотопные маркеры, которые могут являться радиоактивными или тяжелыми изотопами; b) магнитные маркеры *(например,* магнитные частицы); c) редокс-активные фрагменты; d) оптические красители; ферментативные группы *(например,* пероксидаза хрена, β-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза); e) биотинилированные группы; и f) заранее заданные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером *(например,* пара последовательностей лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные маркеры и т.д.) В некоторых вариантах воплощения

метящая группа соединена с антиген-связывающим белком через спейсерные фрагменты различной длины для уменьшения возможного стерического препятствия. Различные способы мечения белков известны специалистам в данной области техники.

Специфичные маркеры включают оптические красители, включая, но не ограничиваясь этим, хромофоры, люминофоры и флуорофоры, при этом последние являются специфичными во многих случаях. Флуорофоры могут являться либо "низкомолекулярными" флуоресцирующими агентами, либо белковыми флуоресцирующими агентами.

Под "флуоресцентным маркером" понимают любую молекулу, которая может быть детектирована благодаря присущим ей флуоресцентным свойствам. Пригодные флуоресцентные маркеры включают, не ограничиваясь этим, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, люциферинновый желтый, Cascade синий, Texas красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon зеленый, красители Alexa Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade синий, Cascade желтый и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Юджин, Орегон, США), FITC, родамин и Texas красный (Pierce, Рокфорд, Иллинойс, США), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания, США). Пригодные оптические красители, включая флуорофоры, описаны в публикации Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland, содержание которой специально включено сюда в качестве ссылки.

Пригодные белковые флуоресцентные маркеры также включают, не ограничиваясь этим, зеленый флуоресцентный белок (GFP), в том числе GFP из видов *Renilla, Ptilosarcus* или *Aequorea* (Chalfie *et al.*, (1994) *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Labs., Inc., номер доступа в Genbank U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., Квебек, Канада;

Stauber, (1998) *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, (1996) *Curr. Biol.* 6:178-182), улучшенный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Labs., Inc.), люциферазу (Ichiki *et al.*, (1993) *J. Immunol.* 150:5408-5417), β-галактозидазу (Nolan *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) и Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, патенты США №№: 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Получение антиген-связывающих белков

Предложенные антитела, не принадлежащие человеку, могут быть получены, например, от любого животного, продуцирующего антитела, такого как мышь, крыса, кролик, козел, осел или все приматы, кроме человека (такие как низшие обезьяны *(например, яванский макак* или *макак-резус*) или высшие приматы *(например,* шимпанзе)). Антитела, не принадлежащие человеку, можно применять, например, в культуре клеток *in vitro* и применениях на основе клеточных культур или в любых других применениях, где не возникает иммунный ответ на антитело или он несущественен, или может быть предотвращен, не является проблемой или желателен. В некоторых вариантах воплощения антитела могут быть получены путем иммунизации полноразмерными β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4 (пример 1), внеклеточным доменом β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4 (пример 2), или двумя белками из β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4 (пример 1), цельными клетками, экспрессирующими FGFR1c, β-Клото или и FGFR1c, и β-Клото (примеры 1 и 3), мембранами, полученными из клеток, экспрессирующих FGFR1c, β-Клото или и FGFR1c, и β-Клото (примеры 1 и 3), белками со сшивками, *например,* сшивками с Fc, содержащими FGFR1c, β-Клото или и FGFR1c, и β-Клото (или их внеклеточные домены), сшитые с Fc (примеры 2 и 3), и другими способами, известными специалистам в данной области техники, *например,* как описано в примерах, представленных здесь.

Альтернативно некоторые не принадлежащие человеку антитела могут быть получены иммунизацией аминокислотами, которые представляют собой сегменты одного или нескольких из белков β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, которые образуют часть эпитопа, с которым связываются некоторые антитела, предложенные здесь. Антитела могут являться поликлональными, моноклональными или могут быть синтезированы в клетках-хозяевах путем экспрессии рекомбинантных ДНК.

Полностью принадлежащие человеку антитела могут быть получены, как описано выше, путем иммунизации трансгенных животных, содержащих иммуноглобулиновые локусы человека, или путем отбора с применением библиотеки в формате фагового дисплея, которая экспрессирует спектр антител человека.

Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены с помощью различных методик, включая стандартную методологию моноклональных антител, *например,* стандартную методику гибридизации соматических клеток, описанную в публикации Kohler and Milstein, (1975) *Nature* 256:495. Альтернативно могут применяться другие методики получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов. Одной пригодной животной системой для получения гибридом является система с использованием мышей, которая представляет собой хорошо разработанную методику. Протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны специалистам в данной области техники. В таких методиках В-лимфоциты от иммунизированных мышей сливают с пригодным иммортализованным партнером для слияния, таким как линия клеток миеломы мыши. Если это необходимо, вместо мышей можно иммунизировать крыс или других млекопитающих, и В-лимфоциты таких животных можно сливать с линией клеток миеломы мыши с образованием гибридом. В альтернативном случае может применяться линия клеток миеломы из источника, отличного от мышей. Методики слияния для получения гибридом также хорошо известны. SLAM-технология (способ получения антител от

селективно отобранного лимфоцита) также может применяться для получения антител.

Предложенные одноцепочечные антитела могут образовываться путем сшивки фрагментов вариабельных доменов (Fv-области) тяжелой и легкой цепей *через* аминокислотный мостик (короткий пептидный мостик), что приводит к образованию единой полипептидной цепи. Такие одноцепочечные молекулы Fv (scFv) можно получить путем вставки ДНК, кодирующей пептидный линкер, между ДНК, кодирующими два полипептида вариабельных доменов (V_L и V_H). Полученные в результате полипептиды могут сворачиваться сами на себя и образовывать антиген-связывающие мономеры или же они могут образовывать мультимеры *(например,* димеры, тримеры или тетрамеры), в зависимости от длины гибкого линкера между двумя вариабельными доменами (Kortt *et al.,* (1997) *Prot. Eng.* 10:423; Kortt *et al.,* (2001) *Biomol. Eng.* 18:95-108). Сочетая различные полипептиды, содержащие V_L и V_H, можно получать мультимерные scFv, которые связываются с различными эпитопами (Kriangkum *et al.,* (2001) *Biomol. Eng.* 18:31-40). Разработанные методики получения одноцепочечных антител включают методики, описанные в патенте США № 4946778; Bird, (1988) *Science* 242:423; Huston *et al.,* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879; Ward *et al.,* (1989) *Nature* 334:544, de Graaf *et al.,* (2002) *Methods Mol Biol* 178:379-387. Одноцепочечные антитела, производные от антител, предложенных здесь, включают в качестве неограничивающих примеров scFv, содержащие сочетания вариабельных доменов вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, указанных в таблице 2, или сочетания вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, которые включают области CDR, указанные в таблицах 3 и 4.

Антитела, предложенные здесь, принадлежащие к одному подклассу, могут быть заменены на антитела из другого подкласса с применением способов переключения подклассов. Таким образом, антитела IgG, например, могут быть получены как

производные антитела IgM и *наоборот*. Такие методики позволяют получать новые антитела, которые обладают антиген-связывающими свойствами данного антитела (исходного антитела), но также демонстрируют биологические свойства, характерные для изотипа или подкласса антител, отличных от изотипа или подкласса исходного антитела. Могут применяться методики рекомбинантных ДНК. В таких методиках могут применяться клонированные ДНК, кодирующие полипептиды конкретного антитела, *например*, ДНК, кодирующая консервативный домен антитела с требуемым изотипом. *См., например,* Lantto *et al.,* (2002) *Methods Mol. Biol.* 178:303-316.

Соответственно, предложенные антитела включают антитела, содержащие, например, описанные сочетания вариабельных доменов, *см. выше,* имеющие требуемый изотип (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE и IgD), а также их Fab- или $F(ab')_2$-фрагменты. Более того, если требуется IgG4, может также требоваться внесение точечной мутации (CPSCP->CPPCP (SEQ ID № 380-381, соответственно, в порядке следования) в шарнирной области, как описано в публикации Bloom *et al.,* (1997) *Protein Science* 6:407, содержание которой включено сюда в качестве ссылки) для ослабления склонности к образованию дисульфидных связей внутри тяжелых цепей, что может приводить к гетерогенности антител IgG4.

Более того, известны также методики получения антител, обладающих различными свойствами *(т.е.* различными аффинностями к антигену, с которым они связываются). Одна такая методика, называемая комбинированием вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, включает представление спектра генов вариабельных доменов иммуноглобулинов на поверхности нитчатого бактериофага, часто называемое фаговым дисплеем. Комбинирование вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей применяли для приготовления высокоаффинных антител к гаптену 2-фенилоксазол-5-ону, как описано в публикации Marks *et al.,* (1992) *BioTechnology* 10:779.

Консервативные модификации могут быть произведены в вариабельных областях тяжелых и легких цепей, описанных в таблице 2, или областях CDR, описанных в таблицах 3A и 3B, 4A и 4B, и в таблице 6C, *ниже* (и соответствующие модификации в кодирующих нуклеиновых кислотах), для получения антиген-связывающего белка, обладающего функциональными и биохимическими особенностями. Способы осуществления таких модификаций описаны выше.

Антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, могут быть дополнительно модифицированы различными способами. Например, если их планируют применять для терапевтических целей, они могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пегилированы) для увеличения периода полувыведения из сыворотки или для улучшения доставки белка. В альтернативном варианте V-область рассматриваемых антител или их фрагменты могут быть сшиты с Fc-областью другой молекулы антитела. Fc-область, применяемая для этой цели, может быть модифицирована таким образом, что она не связывается с комплементом, тем самым снижая вероятность индукции лизиса клеток в организме пациента, когда белок со сшивками применяют как терапевтический агент. Кроме того, рассматриваемые антитела или их функциональные фрагменты могут быть конъюгированы с сывороточным альбумином человека для увеличения периода полувыведения из сыворотки антитела или его фрагментов. Другим полезным партнером для сшивки с антиген-связывающими белками или их фрагментами является транстиретин (TTR). TTR обладает способностью образовывать тетрамер, таким образом, белок со сшивками антитело-TTR может образовывать мультивалентное антитело, что может повысить его авидность связывания.

Альтернативно существенные модификации функциональных и/или биохимических характеристик антиген-связывающих белков,

описанных здесь, могут быть достигнуты путем создания замен в аминокислотных последовательностях тяжелых и легких цепей, которые в существенной степени отличаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры остова молекулы в области замены, например, такой как конформация бета-слоя или спирали, (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (в) объема боковой цепи. "Консервативная аминокислотная замена" может включать замену нативного аминокислотного остатка на ненативный остаток, которая оказывает незначительное влияние или не оказывает влияния на полярность или заряд аминокислотного остатка в этом положении. *См.* таблицу 5 *выше.* Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде также может быть заменен на аланин, как ранее было описано для сканирующего аланином мутагенеза.

Аминокислотные замены (как консервативные, так и неконсервативные) в рассматриваемых антителах могут быть осуществлены специалистам в данной области техники с применением стандартных методик. Аминокислотные замены могут применяться для идентификации важных остатков в антителах, предложенных здесь, или для повышения или снижения аффинности этих антител к одной или нескольким молекулам из (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, или для модификации аффинности связывания других антиген-связывающих белков, описаных здесь.

Способы экспрессии антиген-связывающих белков

Также здесь предложены экспрессионные системы и конструкции в форме плазмид, экспрессионных векторов, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид из описанных выше, а также клетки-хозяева, содержащие такие экспрессионные системы или конструкции.

Антиген-связывающие белки, предложенные здесь, могут быть приготовлены с применением любой из ряда стандартных методик.

Например, антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, могут быть получены с помощью рекомбинантных экспрессионных систем с применением любой методики, известной специалистам в данной области техники. *См., например,* Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.) Plenum Press, New York (1980); и Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

Антиген-связывающие белки могут быть экспрессированы в линиях гибридомных клеток *(например,* в частности, антитела могут быть экспрессированы в гибридомах) или в клеточных линиях, отличных от гибридом. Экспрессионные конструкции, кодирующие антитела, могут применяться для трансформации клетки-хозяина, принадлежащей млекопитающему, насекомому или микроорганизму. Трансформация может осуществляться с применением любого известного способа внедрения полинуклеотидов в клетку-хозяина, включая, например, упаковку полинуклеотида в вирус или бактериофаг и трансдукцию клетки-хозяина конструкцией с помощью процедур трансфекции, известных специалистам в данной области техники, как это описано в примерах в патентах США №№ 4399216, 4912040, 4740461, 4959455. Оптимальная для применения методика трансформации будет зависеть от типа клетки-хозяина, которую необходимо трансформировать. Способы внедрения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, не ограничиваясь этим, декстран-опосредованную трансфекцию, преципитацию фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомах, смешивание нуклеиновой кислоты с положительно заряженными липидами и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

Рекомбинантные экспрессионные конструкции в типичном случае содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий одну или несколько из следующих последовательностей: одну или несколько областей CDR, предложенных здесь; консервативную область легкой цепи; вариабельную область легкой цепи; консервативную область тяжелой цепи *(например,* C_H1, C_H2 и/или C_H3); и/или другую каркасную часть антиген-связывающего белка. Эти последовательности нуклеиновых кислот вставлены в соответствующий экспрессионный вектор с применением стандартных методик лигирования. В одном из вариантов воплощения консервативная область тяжелой или легкой цепи присоединена к С-концу вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела против β-Клото, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4 или комплекса β-Клото и FGFR1c и лигирована в экспрессионный вектор. Вектор в типичном случае выбран таким образом, чтобы он был функциональным в конкретной применяемой клетке-хозяине *(т.е.* вектор является совместимым с механизмами в клетке-хозяине, которые делают возможными амплификацию и/или экспрессию гена). В некоторых вариантах воплощения применяют векторы, которые делают возможным проведение анализа комплементации фрагментов белка с применением белков-репортеров, таких как дигидрофолатредуктаза *(см.*, например, патент США № 6270964, содержание которого включено сюда в качестве ссылки). Пригодные экспрессионные векторы можно приобрести, например, в компаниях Invitrogen Life Technologies или BD Biosciences (ранее – Clontech). Другие полезные векторы для клонирования и экспрессии антител и их фрагментов включают векторы, описанные в публикации Bianchi and McGrew, (2003) *Biotech. Biotechnol. Bioeng.* 84:439-44, содержание которой включено сюда в качестве ссылки. Дополнительные пригодные экспрессионные векторы обсуждаются, например, в публикации *Methods Enzymol.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press.

В типичном случае экспрессионные векторы, применяемые в любых клетках-хозяевах, будут содержать последовательности для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессирования экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности, все вместе называемые "фланкирующими последовательностями", в некоторых вариантах воплощения будут в типичном случае включать одну или несколько из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор; одну или несколько энхансерных последовательностей; ориджин репликации; последовательность терминации транскрипции; полную последовательность интрона, включающую донорный и акцепторный сплайс-сайт; последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида; сайт связывания рибосомы; последовательность полиаденилирования; полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который необходимо экспрессировать; и элемент селектируемого маркера. Каждая из этих последовательностей обсуждается ниже.

Необязательно вектор может содержать последовательность, кодирующий " маркер", *т.е.* олигонуклеотидную молекулу, расположенную с 5'- или 3'-конца от последовательности, кодирующей антиген-связывающий белок; олигонуклеотидная последовательность кодирует поли-His (такой как гекса-His (SEQ ID №: 382)), или другую " маркер", такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или myc, для которой имеются коммерчески доступные антитела. Этот маркер в типичном случае сшивается с полипептидом при экспрессии полипептида и может служить в качестве средства для осуществления аффинной очистки или детекции антиген-связывающего белка в клетке-хозяине. Аффинную очистку можно осуществлять, например, с помощью колоночной хроматографии с применением антител против маркера в качестве аффинной матрицы. Необязательно маркер в дальнейшем может быть удален из очищенного антиген-связывающего белка с

помощью различных способов, таких как применение определенных пептидаз для расщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными *(т.е.* из того же вида и/или штамма, к которому принадлежит клетка-хозяин), гетерологичными *(т.е.* из вида, отличного от вида или штамма клетки-хозяина), гибридными *(т.е.* сочетанием фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. По существу, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любое позвоночное или беспозвоночное, или любое растение, при условии что фланкирующая последовательность является функциональной в клетке-хозяине и может быть активирована с помощью механизмов клетки-хозяина.

Фланкирующие последовательности, полезные для применения в векторах, могут быть получены любым из ряда способов, известных специалистам в данной области техники. В типичном случае фланкирующие последовательности, полезные для применений, описанных здесь, были ранее идентифицированы путем картирования и/или расщепления эндонуклеазами рестрикции и могут быть выделены из подходящего источника ткани с применением подходящих эндонуклеаз рестрикции. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В этом случае фланкирующая последовательность может быть синтезирована с применением способов, описанных здесь для синтеза или клонирования нуклеиновых кислот.

Если известна вся или только часть фланкирующей последовательности, она может быть получена с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с помощью пригодного зонда, такого как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности из того же или другого биологического вида. В случае, когда фланкирующая последовательность не известна, фрагмент ДНК,

содержащий фланкирующую последовательность, может быть выделен из более длинного участка ДНК, который содержит, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или гены. Выделение можно осуществить с помощью расщепления эндонуклеазами рестрикции с получением нужных фрагментов ДНК и с последующим выделением с применением очистки в агарозном геле, хроматографии на колонках компании Qiagen® (Чатсворт, Калифорния, США) или других способов, известных специалистам в данной области техники. Выбор подходящих ферментов для выполнения этой задачи будет достаточно очевиден специалисту в данной области техники.

Ориджин репликации в типичном случае является частью прокариотических экспрессионных векторов, которые имеются в продаже, а функцией ориджина является помощь при амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайт ориджина репликации, можно его синтезировать химически на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, ориджин репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс, США) пригоден для большинства грам-отрицательных бактерий, а различные вирусные ориджины *(например,* вируса SV40, вируса полиомы, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусов, таких как HPV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. В общем случае компонент ориджина репликации не является необходимым для экспрессионных векторов млекопитающих (например, ориджин SV40 часто применяют только потому, что он также содержит ранний промотор вируса).

Последовательность терминации транскрипции в типичном случае расположена с 3'-конца от области, кодирующей полипептид, и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках является G-C-богатым фрагментом, за которым следует последовательность поли-T. Хотя эту последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести у поставщика как часть вектора,

ее также легко можно синтезировать с помощью способов синтеза нуклеиновых кислот, таких как описанные здесь.

Ген селектируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращиваемой в селективной культуральной среде. Типичные гены селектируемых маркеров кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, *например,* к ампициллину, тетрациклину или канамицину в случае прокариотических клеток-хозяев; (б) комплементируют ауксотрофные недостаточности клетки; или (в) предоставляют критически важные питательные вещества, отсутствующие в сложных средах или средах определенного состава. Специфичными селектируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Предпочтительно ген устойчивости к неомицину также может применяться для селекции как прокариотических, так и эукариотических клеток-хозяев.

Другие селектируемые гены могут применяться для амплификации гена, который будет экспрессироваться. Амплификация – это процесс, при котором гены, которые необходимы для получения белка, критически важного для роста или выживаемости клеток, воспроизводятся в тандеме с хромосомами последовательных поколений рекомбинантных клеток. Примеры пригодных селектируемых маркеров для клеток млекопитающих включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) и не содержащий промотора ген тимидинкиназы. Трансформацию клеток млекопитающих производят под давлением отбора, при котором только трансформанты уникальным образом приспособлены для выживания благодаря селектируемому гену, присутствующему в векторе. Давление отбора обеспечивают путем культивирования трансформированных клеток в условиях, при которых концентрация селектирующего агента в среде постепенно повышается, приводя тем самым к амплификации как селектируемого гена, так и ДНК, кодирующей другой ген, такой как антиген-связывающий белок, связывающийся

с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В результате с амплифицированной ДНК синтезируются увеличенные количества полипептида, такого как антиген-связывающий белок.

Сайт связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайна-Дальгарно (у прокариот) или последовательностью Козака (у эукариот). Элемент в типичном случае расположен в 3'-области относительно промотора и в 5'-области относительно последовательности, кодирующей полипептид, который будет экспрессироваться.

В некоторых случаях, например, когда требуется гликозилирование в экспрессионной системе эукариотической клетки-хозяина, можно проводить манипуляции с различными пре- и про-последовательностями для улучшения гликозилирования или выхода. Например, можно изменить сайт расщепления пептидазой конкретного сигнального пептида или добавить про-последовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может иметь, в положении -1 (относительно первой аминокислоты зрелого белка), в результате экспрессии одну или несколько дополнительных аминокислот, которые не могут быть полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или несколько аминокислотных остатков, находящихся в сайте расщепления пептидазой, присоединенных к амино-концу. В альтернативном варианте применение некоторых сайтов ферментативного расщепления может привести к немного укороченной форме требуемого полипептида, если фермент осуществляет разрезание по такой области внутри зрелого полипептида.

Экспрессирующий и клонирующий векторы в типичном случае будут содержать промотор, который узнается организмом-хозяином и функционально присоединен к молекуле, кодирующей антиген-

связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Промоторы – это нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше по течению (*т.е.* с 5'-конца) от стартового кодона структурного гена (обычно в пределах области примерно от 100 до 1000 п.н.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Промоторы традиционно подразделяют на два класса: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы инициируют повышенные уровни транскрипции с ДНК, которая находится под их контролем, в ответ на определенное изменение условий культивирования, такое как присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы обеспечивают постоянный уровень транскрипции гена, к которому они функционально присоединены, т.е. с незначительным контролем или с отсутствием контроля над экспрессией гена. Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Пригодный промотор функционально присоединяют к ДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепи, содержащие антиген-связывающий белок, путем удаления промотора из исходной ДНК с помощью расщепления ферментами рестрикции и вставки последовательности нужного промотора в вектор.

Пригодные промоторы для применения в дрожжевых клетках-хозяевах также хорошо известны специалистам в данной области техники. Предпочтительно с промоторами дрожжей применяют энхансеры дрожжей. Пригодные промоторы для применения в клетках-хозяевах млекопитающих хорошо известны и включают в качестве неограничивающих примеров промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус,

ретровирусы, вирус гепатита B и вакуолизирующий обезьяний вирус 40 (SV40). Другие пригодные промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы генов белков теплового шока и промотор гена актина. Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают в качестве, не ограничиваясь этим: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, (1981) *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen *et al.*,(1984) *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3'-длинном терминальном повторе в геноме вируса саркомы Payca (Yamamoto *et al.*, (1980) *Cell* 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промотор и регуляторные последовательности из гена металлотионеина (Prinster *et al.*, (1982) *Nature* 296:39-42); и прокариотические промоторы, такие как промотор гена бета-лактамазы (Villa-Kamaroff *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); или tac-промотор (DeBoer *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Также представляют интерес следующие регуляторные области, контролирующие транскрипцию в клетках животных, которые демонстрируют ткане-специфичность и применялись в трансгенных животных: регуляторная область гена эластазы I, которая активна в ацинозных клетках поджелудочной железы (Swift *et al.*, (1984) *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*, (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, (1987) *Hepatology* 7:425-515); регуляторная область гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, (1985) *Nature* 315:115-122); регуляторная область иммуноглобулинового гена, активная в лимфоидных клетках (Grosschedl *et al.*, (1984) *Cell* 38:647-658; Adames *et al.*,(1985) *Nature* 318:533-538; Alexander *et al.*, (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); регуляторная область вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках семенников, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder *et al.*,

(1986) *Cell* 45:485-495); регуляторная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert *et al.*, (1987) *Genes and Devel.* 1:268-276); регуляторная область гена альфа-фетопротеина, которая активна в печени (Krumlauf *et al.*, (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, (1987) *Science* 253:53-58); регуляторная область гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey *et al.*, (1987) *Genes and Devel.* 1:161-171); регуляторная область гена бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках (Mogram *et al.*, (1985) *Nature* 315:338-340; Kollias *et al.*, (1986) *Cell* 46:89-94); регуляторная область гена основного белка миелина, которая активна в олигодендроцитных клетках головного мозга (Readhead *et al.*, (1987) *Cell* 48:703-712); регуляторная область гена легкой цепи-2 миозина, которая активна в скелетной мускулатуре (Sani, (1985) *Nature* 314:283-286); и регуляторная область гена гонадотропного релизинг-гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason *et al.*, (1986) *Science* 234:1372-1378).

Энхансерная последовательность может быть вставлена в вектор для усиления транскрипции ДНК, кодирующей легкую цепь или тяжелую цепь, содержащие антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и принадлежит высшим эукариотам, *например,* антиген-связывающий белок человека, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно длиной примерно 10-300 п.н., которые воздействуют на промотор, усиливая транскрипцию. Энхансеры относительно независимы от ориентации и положения, их обнаруживали как в 5'-, так и в 3'-области относительно транскрипционной единицы. Известны несколько энхансерных последовательностей, доступных

для генов млекопитающих *(например,* генов глобинов, эластазы, альбумина, альфа-фетопротеина и инсулина). Однако, в типичном случае применяют энхансер, принадлежащий вирусу. Известные специалистам в данной области техники энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы и энхансеры аденовирусов являются примерами энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер можно расположить в вектор либо 5'-, либо 3'-области относительно кодирующей последовательности, в типичном случае он расположен в сайте, находящемся с 5'-конца относительно промотора. Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть внедрена в экспрессионный вектор для обеспечения секреции антитела во внеклеточную среду. Выбор сигнального пептида или лидера зависит от типа клеток-хозяев, в которых будет продуцироваться антитело, и гетерологичная сигнальная последовательность может замещать собой нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, которые функциональны в клетках-хозяевах из млекопитающих, включают следующее: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в публикации Cosman *et al.*, (1984) *Nature* 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в патенте ЕР № 0367 566; сигнальный пептид рецептора I типа интерлейкина-1, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора II типа интерлейкина-1, описанный в патенте ЕР № 0 460 846.

Предложенные экспрессионные векторы могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как имеющийся в продаже вектор. Такие векторы могут, но необязательно, содержать все требуемые фланкирующие последовательности. В случае, если одна или несколько из описанных здесь фланкирующих последовательностей не присутствуют в векторе, их можно получить отдельно и

лигировать в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалистам в данной области техники.

После того, как вектор был сконструирован, а молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь, тяжелую цепь или легкую и тяжелую цепи, содержащие антиген-связывающий белок, который специфично связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, была вставлена в соответствующий сайт вектора, полученный вектор можно внедрить в пригодную клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептидов. Трансформацию вектором антиген-связывающего белка выбранной клетки-хозяина можно производить хорошо известными способами, включая трансфекцию, инфекцию, преципитацию фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекци, липофекцию, ДЕАЕ-декстран-опосредованную трансфекцию и другие известные методики. Выбранный способ частично будет зависеть от типа клетки-хозяина, которую будут использовать. Эти способы и другие пригодные способы хорошо известны специалистам в данной области техники и изложены, например, в публикации Sambrook *et al.*, (2001), *см. ранее.*

Клетка-хозяин, при культивировании в соответствующих условиях, синтезирует антиген-связывающий белок, который впоследствии может быть выделен из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из продуцирующей его клетки-хозяина (если он не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые желательны или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и простота сворачивания в биологически активную молекулу.

Линии клеток млекопитающих, доступные для применения в качестве клеток-хозяев для экспрессии, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают в качестве

неограничивающих примеров иммортализованные клеточные линии, которые можно приобрести в Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая в качестве неограничивающих примеров клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека *(например,* Hep G2) и ряд других клеточных линий. В некоторых вариантах воплощения клеточные линии могут быть выбраны путем определения того, какие клеточные линии обеспечивают высокие уровни экспрессии и конститутивно продуцируют антиген-связывающие белки с требуемыми свойствами связывания *(например,* со способностью связываться с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4). В другом варианте воплощения может быть выбрана клеточная линия, происходящая от линии B-лимфоцитов, которые не производят собственные антитела, но способны продуцировать и секретировать гетерологичные антитела. Способность индуцировать FGF21-подобный сигналлинг также может являться критерием отбора.

Применение антиген-связывающих белков для диагностических и терапевтических целей

Антиген-связывающие белки, раскрытые здесь, полезны для детекции (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, в биологических пробах и идентификации клеток или тканей, которые продуцируют одну или несколько из молекул (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекс, содержащий β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Например, антиген-связывающие белки, раскрытые здесь, могут применяться при диагностических исследованиях, *например,* при анализе связывания для детекции и/или количественного определения (i)

β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, экспрессируемых в ткани или клетке. Антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, могут применяться при лечении заболеваний, связанных с FGF21-подобным сигналлингом, у пациентов, которым это требуется, например, с диабетом 2 типа, ожирением, дислипидемией, НАСГ, сердечно-сосудистым заболеванием и метаболическим синдромом. Путем образования участвующего в сигналлинге комплекса, который содержит антиген-связывающий белок и (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекс, содержащий β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, можно имитировать и/или усилить природную активность *in vivo* фактора FGF21, которая связана с FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4 и β-Клото *in vivo* и инициирует сигналлинг, и это приведет к получению терапевтических воздействий.

Показания

Заболевание или состояние, связанные с FGF21 человека, включают любое заболевание или состояние, чье возникновение у пациента вызвано, по меньшей мере частично, индукцией FGF21-подобного сигналлинга, который инициируется *in vivo* при образовании комплекса, содержащего FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4, а также β-Клото и FGF21. Также индукция FGF21-подобного сигналлинга может снизить тяжесть проявления заболевания или состояния. Примеры заболеваний и состояний, которые могут быть подвергнуты лечению с применением антиген-связывающих белков, включают диабет 2 типа, ожирение, дислипидемию, НАСГ, сердечно-сосудистое заболевание и метаболический синдром.

Антиген-связывающие белки, описанные здесь, также могут применяться для лечения диабета 2 типа, ожирения,

дислипидемии, НАСГ, сердечно-сосудистого заболевания или метаболического синдрома или могут применяться в качестве профилактического лечения, вводимого, *например,* ежедневно, раз в неделю, два раза в неделю, раз в месяц, два раза в месяц, два раза в год и т.д., для предотвращения или снижения частоты и/или тяжести симптомов, *например,* повышенных уровней глюкозы в плазме, повышенных уровней триглицеридов и холестерина, тем самым обеспечивая улучшенный гликемический и сердечно-сосудистый профиль факторов риска.

Способы диагностики

Антиген-связывающие белки, описанные здесь, могут применяться в диагностических целях для детекции, диагностики или мониторинга заболеваний и/или состояний, связанных с FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4, β-Клото, FGF21 или их сочетаниями. Также предложены способы детекции присутствия (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, в пробе с применением классических иммуногистологических способов, известных специалистам в данной области техники *(например,* Tijssen, 1993, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays,* Vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques,* pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen *et al.,* (1985) *J. Cell. Biol.* 101:976-985; Jalkanen *et al.,* (1987) *J. Cell Biol.* 105:3087-3096). Детекцию (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, можно проводить *in vivo* или *in vitro.*

Предложенные здесь диагностические приложения включают применение антиген-связывающих белков для детекции экспрессии (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c,

FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, и/или связывания с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. Примеры способов, полезных для детекции присутствия (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, включают иммуноанализ, такой как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (РИА).

Для диагностических применений антиген-связывающий белок в типичном случае будет помечен детектируемой метящей группой. Пригодные метящие группы включают, не ограничиваясь этим, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (*например,* ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), флуоресцентные группы (*например,* FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантаноидов), ферментативные группы (*например,* пероксидазу хрена, β-галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или заранее заданные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (*например,* пара последовательностей лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные маркеры). В некоторых вариантах воплощения метящая группа соединена с антиген-связывающим белком через спейсерные фрагменты различной длины для уменьшения возможного стерического препятствия. Различные способы мечения белков известны специалистам в данной области техники и могут применяться.

Согласно одному аспекту антиген-связывающий белок может применяться для идентификации клеток, экспрессирующих (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекс, содержащий β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В конкретном примере воплощения антиген-связывающий белок помечен метящей группой, и детектируется связывание меченого антиген-связывающего белка с (i) β-Клото;

(ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4. В еще одном конкретном варианте воплощения связывание антиген-связывающего белка с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, детектируют *in vivo*. В дополнительном конкретном варианте воплощения антиген-связывающий белок выделяют и количественно определяют, применяя методики, известные специалистам в данной области техники. *См.*, например, *Harlow and Lane,* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual,* New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 and periodic supplements); *John E. Coligan, ed.,* (1993) *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons.

Другой аспект обеспечивает возможность детекции присутствия тестируемой молекулы, которая конкурирует за связывание (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, с предложенными антиген-связывающими белками, как раскрыто здесь. Пример одного такого способа анализа может включать определение количества свободного антиген-связывающего белка в растворе, содержащем некоторое количество одной или нескольких из молекул (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, в присутствии или в отсутствие тестируемой молекулы. Повышение количества свободного антиген-связывающего белка (*т.е.* антиген-связывающего белка, не связанного с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4) будет свидетельствовать, что тестируемая молекула способна конкурировать за связывание (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплекса, содержащего β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, с антиген-связывающим белком. В одном из вариантов воплощения

антиген-связывающий белок помечен метящей группой. В альтернативном варианте помечена тестируемая молекула, и производят мониторинг количества свободной тестируемой молекулы в присутствии или в отсутствие антиген-связывающего белка.

Способы лечения: Фармацевтические лекарственные формы и способы введения

Также предложены способы применения антиген-связывающих белков. В некоторых способах антиген-связывающий белок вводят пациенту. Антиген-связывающий белок индуцирует FGF21-подобный сигналлинг.

Предложены также фармацевтические композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество одного или нескольких антиген-связывающих белков и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, агент, повышающий растворимость, эмульгирующий агент, консервант и/или адъювант. Кроме того, включены способы лечения пациента путем введения такой фармацевтической композиции. Термин "пациент" включает пациентов, являющихся людьми.

Приемлемые материалы для лекарственных форм нетоксичны для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. В конкретных вариантах воплощения предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество антиген-связывающих белков человека, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4.

В некоторых вариантах воплощения приемлемые материалы для лекарственных форм предпочтительно нетоксичны для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. В некоторых вариантах воплощения фармацевтическая композиция может содержать материалы для лекарственных форм с целью модификации, поддержания или сохранения, например, значения

pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цветности, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции. В таких вариантах воплощения пригодные материалы для лекарственных форм включают, не ограничиваясь этим, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); антимикробные агенты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферные агенты (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемообразующие агенты (такие как маннитол или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразователи (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); агенты, придающие цветность, вкус и запах; разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или водорода пероксид); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннитол или сорбитол); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как Плюроники, ПЭГ, эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбитол); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно – натрия или калия хлорид, маннитол, сорбитол); носители для доставки;

разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты. *См.* Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (A.R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company. В некоторых вариантах воплощения оптимальная фармацевтическая композиция будет определена специалистом в данной области техники, в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозы. *См.*, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, *выше*. В некоторых вариантах воплощения такие композиции могут оказывать воздействие на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* раскрытых антиген-связывающих белков. В некоторых вариантах воплощения основной носитель в фармацевтической композиции может быть либо водным, либо неводным по природе. Например, пригодный носитель может быть водой для инъекций, физиологическим раствором натрия хлорида или искусственной спинномозговой жидкостью, возможно, с добавлением других материалов, стандартных для композиций, предназначенных для парентерального введения. Нейтральный буферизированный раствор натрия хлорида или раствор натрия хлорида в смеси с сывороточным альбумином являются дополнительными примерами носителей. В конкретных примерах воплощения фармацевтические композиции содержат трис-буферный раствор с примерным значением pH 7,0-8,5 или ацетатный буферный раствор с примерным значением pH 4,0-5,5 и могут дополнительно включать сорбитол или подходящую замену. В некоторых вариантах воплощения композиции, содержащие антиген-связывающие белки, которые специфично связываться с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, могут быть приготовлены для хранения путем смешивания выбранной композиции, обладающей требуемой степенью чистоты, с необязательными агентами лекарственной формы (Remington's Pharmaceutical Sciences, *см. выше)* в виде лиофилизированного

осадка или водного раствора. Дополнительно в некоторых вариантах воплощения антиген-связывающий белок, который связывается с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, может быть изготовлен в виде лекарственной формы, представляющей собой лиофилизат, с помощью применения соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции могут быть выбраны для парентерального введения. В альтернативном варианте композиции могут быть выбраны для ингаляции или доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Способы приготовления таких фармацевтически приемлемых композиций известны специалистам в данной области техники.

Компоненты лекарственной формы предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для области введения. В некоторых вариантах воплощения применяют буферные растворы для поддержания композиции на уровне физиологического значения pH или немного более низком уровне pH, в типичном случае - в диапазоне значений pH от примерно 5 до примерно 8.

Когда предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции могут вводиться в форме апирогенного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего требуемый антиген-связывающий белок в фармацевтически приемлемом носителе. Фармацевтически приемлемым носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой препарат антиген-связывающего белка приготавливается в виде стерильного, изотонического раствора, с должным уровнем консервации. В некоторых вариантах воплощения приготовление может включать составление смеси требуемой молекулы с агентом, таким как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), шарики или липосомы, которые могут обеспечить контролируемое

или замедленное высвобождение продукта, который может быть введен посредством инъекции веществ замедленного всасывания. В некоторых вариантах воплощения может применяться гиалуроновая кислота, которая может обладать эффектом, способствующим более длительному сохранению в кровеносной системе. В некоторых вариантах воплощения для введения требуемого антиген-связывающего белка могут применяться имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства.

Некоторые фармацевтические композиции разработаны для ингаляции. В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающие белки, которые связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, приготовлены в виде сухого ингаляционного порошка. В конкретных вариантах воплощения ингаляционные растворы антиген-связывающих белков также могут быть приготовлены в виде лекарственной формы с газом-вытеснителем для аэрозольной доставки. В некоторых вариантах воплощения растворы могут распыляться. Способы легочного введения и приготовления лекарственных форм дополнительно описаны в международной заявке на патент № PCT/US94/001875, которая включена сюда в качестве ссылки и описывает легочное введение химически модифицированных белков. Некоторые лекарственные формы могут быть введены перорально. Антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, которые вводят таким способом, могут быть приготовлены вместе с носителями или без носителей, обычно применяемыми при приготовлении твердых лекарственных форм, таких как таблетки или капсулы. В некоторых вариантах воплощения могут быть разработаны капсулы для высвобождения активной части лекарственной формы в конкретной области желудочно-кишечного тракта, когда биодоступность максимальна, а деградация до попадания в

систему минимальна. Дополнительные агенты могут быть включены для облегчения абсорбции антиген-связывающего белка. Также могут применяться разбавители, вкусовые агенты, низкоплавкие воски, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, агенты, способствующие распадаемости таблеток, и связующие вещества.

Некоторые фармацевтические композиции содержат эффективное количество одного или нескольких антиген-связывающих белков, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, в смеси с нетоксичными вспомогательными веществами, которые пригодны для производства таблеток. Растворяя таблетки в стерильной воде или другом соответствующем носителе, можно приготовить растворы в форме унифицированной дозы. Пригодные вспомогательные вещества включают, не ограничиваясь этим, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связывающие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик; или смазывающие агенты, такие как магния стеарат, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции будут очевидны для специалистов в данной области техники, включая лекарственные формы, содержащие антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, в виде лекарственных форм для замедленного или контролируемого высвобождения. Методики приготовления лекарственных форм со средствами для замедленного или контролируемого высвобождения, такими как липосомные носители, биоразлагаемые частицы или пористые шарики и инъекции веществ замедленного всасывания, хорошо известны специалистам в данной области техники. *См.*, например, международную заявку на патент № PCT/US93/00829,

которая включена сюда в качестве ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде имеющих определенную форму изделий, *например,* пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать полиэфиры, гидрогели, полилактиды (как раскрыто в патенте США № 3773919 и в Европейской публикации заявки на патент № EP 058481, содержание которых целиком включено сюда в качестве ссылки), со-полимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman *et al.,* 1983, *Biopolymers* 2:547-556), поли-(2-гидроксиэтилинетакрилат) (Langer *et al.,* 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer *et al.,* 1981, *см. выше)* или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (Европейская публикация заявки на патент № EP 133,988). Композиции с замедленным высвобождением также могут включать липосомы, которые могут быть приготовлены любым из нескольких способов, известных специалистам в данной области техники. *См., например,* Eppstein *et al.,* 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; Европейские публикации заявок на патент №№ EP 036,676; EP 088,046 и EP 143,949, содержание которых включено сюда в качестве ссылки.

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo,* в типичном случае получают в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно осуществлять путем фильтрации через стерильные мембранные фильтры. Если композиция лиофилизирована, стерилизация с применением этого способа может быть проведена либо перед, либо после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции в общем случае помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, в пакет для

внутривенных растворов или флакон с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций.

В некоторых вариантах воплощения клетки, экспрессирующие рекомбинантный антиген-связывающий белок, как описано здесь, инкапсулируют с целью доставки (см. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* (2002) 43:3292-3298 и *Proc. Natl. Acad. Sciences USA* (2006) 103:3896-3901).

В некоторых лекарственных формах антиген-связывающий белок имеет концентрацию по меньшей мере 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл или 150 мг/мл. Некоторые лекарственные формы содержат буфер, сахарозу или полисорбат. Примерами лекарственных форм являются таковые, содержащие 50-100 мг/мл антиген-связывающего белка, 5-20 мМ ацетата натрия, 5-10% (масса/объем) сахарозы и 0,002-0,008% (масса/объем) полисорбата. Некоторые лекарственные формы содержат, например, 65-75 мг/мл антиген-связывающего белка, 9-11 мМ натрийацетатного буфера, 8-10% (масса/объем) сахарозы и 0,005-0,006% (масса/объем) полисорбата. Значение pH некоторых таких лекарственных форм находится в диапазоне 4,5–6. Другие лекарственные формы имеют pH 5,0–5,5 *(например,* pH 5,0, 5,2 или 5,4).

После приготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристаллического вещества или в виде дегидратированного или лиофилизованного порошка. Такие лекарственные формы можно хранить либо в форме, готовой к применению, либо в форме *(например,* лиофилизованной), которую восстанавливают перед введением. Также предложены наборы для получения единицы для введения разовой дозы. Некоторые наборы включают первый контейнер, содержащий высушенный белок, и второй контейнер, содержащий водную лекарственную форму. В некоторых вариантах воплощения предложены наборы, содержащие одно- или многокамерные

предварительно заполненные шприцы (*например*, шприцы с жидкостью или шприцы с лиофилизатом). Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей антиген-связывающий белок, которое необходимо применять, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалисту в данной области техники будет понятно, что соответствующие уровни дозировок для лечения будут меняться, в частности, в зависимости от вводимой молекулы, показания, для которого будет применяться антиген-связывающий белок, пути введения и размера (массы тела, площади поверхности тела или размера органа), и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. В некоторых вариантах воплощения клиницист может провести титрование дозировки и изменить путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта.

В типичном случае дозировка может находиться в диапазоне от примерно 1 мкг/кг до примерно 30 мг/кг или более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. В конкретных примерах воплощения дозировка может находиться в диапазоне от примерно 10 мкг/кг до примерно 30 мг/кг, необязательно – от 0,1 мг/кг до примерно 30 мг/кг, в альтернативном варианте – от 0,3 мг/кг до примерно 20 мг/кг. В некоторых вариантах применения дозировка составляет от 0,5 мг/кг до 20 мг/кг. В некоторых случаях доза антиген-связывающего белка составляет 0,3 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг. График введения доз при некоторых лечебных режимах составляет при дозе 0,3 мг/кг раз в неделю, 0,5 мг/кг раз в неделю, 1 мг/кг раз в неделю, 3 мг/кг раз в неделю, 10 мг/кг раз в неделю или 20 мг/кг раз в неделю.

Частота введения доз будет зависеть от фармакокинетических параметров конкретного антиген-связывающего белка, применяемого в лекарственной форме. В типичном случае клиницист производит введение композиции до достижения дозировки, которая обеспечивает требуемый эффект. Следовательно, композицию можно вводить в виде разовой дозы

или в виде двух и более доз (которые могут, необязательно, содержать одинаковое количество требуемой молекулы) в течение определенного времени или в виде непрерывной инфузии *посредством* имплантируемого устройства или катетера. Пригодные дозировки могут быть определены посредством применения соответствующих данных по зависимости доза-эффект. В некоторых вариантах воплощения антиген-связывающие белки можно вводить пациенту в течение продолжительного периода времени. Хроническое введение антиген-связывающего белка минимизирует нежелательный иммунный или аллергический ответ, обычно связанный с антиген-связывающими белками, которые не являются полностью принадлежащими человеку, например, антителом, полученным против антигена человека в животном, отличном от человека, например, не являющимся полностью принадлежащим человеку антителом или не являющимся принадлежащим человеку антителом, полученным от биологического вида, отличного от человека.

Путь введения фармацевтической композиции соответствует известным способам, *например,* перорально, путем инъекции: внутривенной, интраперитонеальной, интрацеребральной (интрапаренхиматозной), интрацеребровентрикулярной, внутримышечной, внутриглазной, внутриартериальной, интрапортальной или внутриочаговой; с помощью систем непрерывного высвобождения или с помощью имплантируемых устройств. В некоторых вариантах воплощения композиции могут быть введены в виде инъекции ударной дозы вещества или в виде непрерывной инфузии, или с применением имплантируемого устройства.

Композицию также можно вводить местно, *посредством* имплантации мембраны, губки или другого соответствующего материала, в котором была абсорбирована или инкапсулирована требуемая молекула. В некоторых вариантах воплощения, при применении имплантируемых устройств, последнее может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка требуемой

молекулы может осуществляться *посредством* диффузии, ударной дозы, запрограммированной по времени или непрерывного введения.

Также может быть желательным применять композиции с антиген-связывающим белком *ex vivo*. В таком случае клетки, ткани или органы, которые были удалены из организма пациента, подвергают воздействию фармацевтических композиций, содержащих антиген-связывающий белок, после чего клетки, ткани и/или органы впоследствии имплантируют обратно в организм человека.

В частности, антиген-связывающие белки, которые специфично связываются с (i) β-Клото; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4; или (iii) комплексом, содержащим β-Клото и одну из молекул FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c и FGFR4, могут быть доставлены путем имплантации определенных леток, которые были созданы генно-инженерными способами, с применением таких способов, как описанные здесь, для экспрессии и секреции полипептида. В некоторых вариантах воплощения такие клетки могут быть клетками человека или животных и могут быть аутологичными, гетерологичными или ксеногенными. В некоторых вариантах воплощения клетки могут быть иммортализованными. В других вариантах воплощения для снижения вероятности иммунологического ответа клетки могут быть инкапсулированы, чтобы избежать инфильтрации окружающих тканей. В дополнительных вариантах воплощения материалы для инкапсуляции в типичном случае являются биосовместимыми, полупроницаемыми полимерными капсулами или мембранами, которые позволяют высвобождаться белковому продукту (продуктам), но предотвращают разрушение клеток иммунной системой пациента или под воздействием других неблагоприятных факторов, происходящих от окружающих тканей.

Комбинированная терапия

Еще одной особенностью является то, что настоящее изобретение направлено на создание способа лечения субъекта от диабета с

применением терапевтического антиген-связывающего белка по настоящему изобретению, такого как полностью принадлежащие человеку антитела, описанные здесь, вместе с одним или несколькими другими способами лечения. В одном из вариантов воплощения такая комбинированная терапия дает аддитивный или синергичный эффект. Антиген-связывающие белки можно вводить в сочетании с один или несколькими доступными в настоящее время лекарственными средствами для лечения диабета 2 типа или ожирения. Эти лекарственные средства для лечения диабета включают бигуанид (метаформин) и производные сульфонилмочевины (такие как глибурид, глипизид). Дополнительные лекарственные средства, предназначенные для поддержания гомеостаза глюкозы, включают агонисты гамма-РАПП (пиоглитазон, росиглитазон); глиниды (меглитинид, репаглинид и натеглинид); ингибиторы ДПП-4 (Januvia® (Янувия®) и Onglyza® (Онглиза®)) и ингибиторы альфа-глюкозидазы (акарбоза, воглибоза).

Дополнительные лекарственные средства для комбинированной терапии диабета включают инъекционные лекарственные средства, такие как миметики инсулина и инкретина (Byetta® (Баетта®), Exenatide® (Эксенатид®)), другие аналоги GLP-1 (глюкагоноподобного пептида), такие как лираглутид, другие агонисты GLP-1R и Symlin® (Симлин®, прамлинтид).

Дополнительные лекарственные средства для комбинированной терапии, направленной на снижение массы тела, включают Meridia® (Меридиа®) и Xenical® (Ксеникал®).

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, приведены исключительно для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как лимитирующие.

ПРИМЕР 1

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ FGFR1c, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНА

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полноразмерный полипептид FGFR1c человека (SEQ ID №: 4; фигуры 1A-1B), и отдельную последовательность, кодирующую полноразмерный полипептид β-Клото человека (SEQ ID №: 7; фигуры 2A-2C), субклонировали в пригодные экспрессионные векторы для клеток млекопитающих *(например,* pcDNA3.1 Zeo, pcDNA3.1 Hyg (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) или pDSRα20. Вектор pDSRα20 содержит ранний промотор/энхансер SV40 для экспрессии представляющего интерес гена и экспрессионную кассету DHFR мыши для проведения селекции в клетках-хозяевах CHO DHFR (-), таких как AM1 CHO (производных от DG44, CHO DHFR (-)).

Клетки AM-1 CHO посеяли при плотности 1,5 x 10^6 клеток на чашку 100 мм. Через 24 ч клетки котрансфецировали линеаризованными молекулами ДНК векторов pDSRα20/huFGFR1c и pDSRα20/huβ-Клото с FuGene6 (Roche Applied Science). Трансфецированные клетки трипсинизировали через 2 дня после трансфекции и посеяли в селективную для CHO DHFR питательную среду, содержащую 10% диализованную FBS (сыворотку плодов крупного рогатого скота) и не содержащую добавки гипоксантина/тимидина. Через 2 недели полученные в результате трансфецированные клоны трипсинизировали и собирали.

Клетки HEK293T трансфецировали полноразмерными huFGFR1c и huβ-Клото в векторе серии pcDNA3.1 или векторе на основе pTT14 (экспрессионный вектор, разработанный компанией Durocher, NRCC, с CMV-промотором и EBV-ориджином, схожими с pTT5, и селективным маркером для пуромицина) и проводили селекцию с помощью соответствующего лекарственного средства, следуя схожей методике, применяемой для трансфекции и селекции клеток CHO.

Собранные трансфецированные FGF21R *(т.е.* FGFR1c и β-Клото) клетки AM1 CHO или 293T сортировали несколько раз с

применением меченного красителем Alexa 647 белка FGF21. Используемый в качестве реагента, окрашивающего поверхность клеток, FGF21 был помечен красителем Alexa 647-NHS согласно способу, рекомендованному производителем (Molecular Probes, Inc. Cat A 2006). Меченный Alexa 647 белок FGF21 демонстрировал специфичное окрашивание клеток, экспрессирующих рецептор FGF21R, и не окрашивал нетрансфецированные исходные клетки (фиг. 3). Клетки с высоким уровнем экспрессии собирали в конце последнего этапа сортинга, разбавляли и замораживали в виалах. Клетки AM-1/huFGF21R приготовили для иммунизации, а клетки 293T/huFGF21R применяли для титрования сыворотки мыши на FACS (клеточном сортере с возбуждением флуоресценции) после иммунизации и при скрининге на связывание супернатантов, полученных от гибридом, способом FMAT (см. пример 4).

ПРИМЕР 2

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОГО КОМПЛЕКСА FGFR1c/β-КЛОТО ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНА

Конструкции растворимого рецептора FGF21 получали в экспрессионных векторах pTT14 или pcDNA3.1. Конструкция FGFR1c ECD-Fc (SEQ ID №: 362, фиг. 4) содержит N-концевой внеклеточный домен белка FGFR1c (аминокислотные остатки №№ 1-374; SEQ ID №: 5), сшитый с Fc (SEQ ID №: 384). Конструкция β-Клото ECD-Fc (SEQ ID №: 363, фиг. 5) содержит N-концевой внеклеточный домен белка β-Клото (аминокислотные остатки №№ 1-996; SEQ ID №: 8), сшитый с Fc (SEQ ID №: 384).

Клетки HEK293 (293F, Invitrogen) трансфецировали конструкциями huFGFR1c ECD-Fc/pTT5, huβ-Клото ECD-Fc/pTT14-puro и dGFP/pcDNA3.1-Neo и проводили селекцию в присутствии соответствующих лекарственных препаратов с последующим повторяющимся сортингом на FACS на основании экспрессии dGFP. Клетки выращивали в бессывороточной среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением заменимых аминокислот во

флаконах HyperFlasks (Corning) в течение 4 дней и собирали кондиционированную среду (CM) для проведения очистки.
293 CM концентрировали в 6 раз и наносили на колонку Белок A-FF, уравновешенную с PBS (фосфатно-солевым буфером). Белок элюировали буфером для элюции Pierce Gentle Ag/Ab. Собранный препарат белка A диализовали против 20 мМ трис-HCl, pH 7, 10 мМ NaCl и наносили на колонку SP HP при pH 7,0. FGFR1c ECD-Fc присутствовал в проточной фракции (FT), а гетеродимер элюировали линейным градиентом 0–0,4 M NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,0. Секвенирование N-концевой аминокислотной последовательности подтвердило, что очищенный растворимый FGF21R является гетеродимером, состоящим в соотношении (1:1) из FGFR1c ECD-Fc и β-Клото ECD-Fc. Очищенный растворимый FGF21R-Fc (фиг. 6) применяли в качестве антигена для иммунизации.

ПРИМЕР 3

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Иммунизацию проводили, применяя одну или несколько пригодных форм антигена рецептора для FGF21, включая: (1) связанный с клетками рецептор трансфецированных клеток CHO, экспрессирующих полноразмерные FGFR1c человека и β-Клото на поверхности, полученных трансфекцией клеток CHO молекулами кДНК, кодирующей полноразмерный полипептид FGFR1c человека с SEQ ID №: 4 (см. также фиг. 1a-b), и кДНК, кодирующей полипептид β-Клото человека с SEQ ID №: 7 (см. также фиг. 2a-c); (2) экстракт мембран вышеуказанных клеток, экспрессирующих рецепторный комплекс FGF21R; или (3) растворимый рецептор FGF21R, получаемый ко-экспрессией N-концевого внеклеточного домена (ECD) белка FGFR1c (SEQ ID №: 5; см. также фиг. 4) и N-концевого внеклеточного домена (ECD) белка β-Клото (SEQ ID №: 8; см. также фиг. 5), или (4) их сочетания.
Подходящее количество иммуногена (*т.е.* 10 мкг на мышь растворимого FGF21R или 3-4 x 10^6 клеток на мышь в случае

стабильно трансфецированных клеток CHO, или 150 мкг на мышь очищенных мембран с FGF21R, приготовленных из клеток CHO, стабильно экспрессирующих FGF21R) применяли для начальной иммунизации мышей XenoMouse™ согласно способам, раскрытым в заявке на патент США № 08/759620, поданной 3 декабря 1996 г., и международных заявках на патент №№ WO 98/24893 и WO 00/76310, раскрытия которых целиком включены сюда в качестве ссылок. После начальной иммунизации последующие повторные иммунизации иммуногеном (5 мкг на мышь растворимого FGF21R или 1,7 x 10^6 трансфецированных FGF21R клеток на мышь, или 75 мкг очищенных мембран с FGF21R) проводили по схеме и в течение периода времени, которые были необходимы для выработки у мышей подходящего титра антител против FGF21R. Титры определяли подходящим способом, например, с помощью иммуноферментного анализа, флуоресцентно-активированного клеточного сортинга (FACS) или иными способами (включая сочетания иммуноферментного анализа и FACS).

Выявляли животных, демонстрирующих подходящие титры, получали лимфоциты из дренирующих лимфатических узлов и, при необходимости, объединяли в каждой когорте. Лимфоциты отделяли от лимфоидной ткани измельчением в подходящей среде (например, среде Игла в модификации Дульбекко, DMEM, приобретенной в компании Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) для высвобождения клеток из тканей и суспендировали в DMEM. В-лимфоциты отбирали и/или культивировали с применением стандартных способов и проводили слияние с пригодным партнером для слияния, например, с не способными к секреции клетками миеломы P3X63Ag8.653 (Американская коллекция типовых культур, CRL 1580; Kearney et al, *J. Immunol.* 123, 1979, 1548-1550), применяя методики, известные специалистам в данной области техники.

В одном подходящем способе слияния лимфоциты смешивали с клетками-партнерами для слияния в соотношении 1:4. Смесь клеток аккуратно осадили центрифугированием при 400г в течение

4 мин, супернатант отбросили и аккуратно перемешали смесь клеток (например, с помощью пипетки на 1 мл). Слияние индуцировали с помощью ПЭГ/ДМСО (полиэтиленгликоль/диметилсульфоксид; приобретены у компании Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США; 1 мл на миллион лимфоцитов). ПЭГ/ДМСО медленно добавляли при мягком перемешивании в течение одной минуты с последующим перемешиванием в течение одной минуты. Затем добавляли среду IDMEM (DMEM без глутамина; 2 мл на миллион В-лимфоцитов) в течение 2 мин. при мягком перемешивании, после чего добавляли еще среды IDMEM (8 мл на миллион В-лимфоцитов) в течение 3 мин.

Слитые клетки осадили (400г, 6 мин.) и ресуспендировали в 20 мл селектирующей среды (например, DMEM, содержащей азасерин и гипоксантин [HA] и другие вспомогательные вещества, если это необходимо) на миллион В-лимфоцитов. Клетки инкубировали в течение 20-30 мин. при 37°C и затем ресуспендировали в 200 мл селектирующей среды, и культивировали в течение от трех до четырех дней во флаконах T175 перед нанесением на 96-луночные планшеты.

Клетки распределяли в 96-луночные планшеты, применяя стандартные методики, чтобы получить максимальную клональность полученных в результате клонов. Через несколько дней культивирования супернатанты собирали и подвергали скрининговому исследованию, более подробно описанному в примерах ниже, включая подтверждение связывания с рецептором для FGF21 человека, специфичности и/или межвидовой перекрестной реактивности. Показавшие положительные результаты клетки дополнительно отбирали и подвергали стандартным методикам клонирования и субклонирования. Клональные клеточные линии культивировали in vitro и получали секретируемые антитела человека для проведения анализа.

Таким образом, мышей иммунизировали либо клетками или мембранами, экспрессирующими полноразмерный FGF21R, либо

растворимым внеклеточным доменом FGF21R с диапазоном 11-17 иммунизаций в течение периода времени, равного примерно от одного до трех с половиной месяцев. Было получено несколько клеточных линий, секретирующих антитела, специфичные к FGF21R, и эти антитела были дополнительно охарактеризованы. Их последовательности представлены здесь в перечне последовательностей, а также приведены результаты различных тестов с применением этих антител.

ПРИМЕР 4

ОТБОР СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АНТИТЕЛ С ПРИМЕНЕНИЕМ FMAT

После 14 дней культивирования проводили скрининг супернатантов гибридом на наличие специфичных к FGF21R моноклональных антител с применением методики флуоресцентного микроволюметрического анализа (FMAT), выполняя скрининговые исследования либо против клеточной линии CHO AM1/huFGF21R, либо против рекомбинантных клеток HEK293, трансфецированных FGF21R человека, а также скрининг на отсутствие нежелательных свойств против исходных клеток CHO или HEK293. Коротко, клетки в среде Freestyle (Invitrogen) наносили на 384-луночные планшеты для FMAT в объеме 50 мкл/лунку при плотности 4000 клеток/лунку в случае стабильно трансфецированных клеток, при плотности 16000 клеток/лунку для исходных клеток, и инкубировали клетки в течение ночи при 37°C. Добавили 10 мкл/лунку супернатанта и инкубировали планшеты в течение примерно одного часа при 4°C, после чего добавляли 10 мкл/лунку вторичного антитела против IgG человека, меченого Cy5, в концентрации 2,8 мкг/мл (конечная концентрация 400 нг/мл). Затем планшеты инкубировали в течение одного часа при 4°C и проводили считывание данных по флуоресценции с помощью системы для детекции FMAT Cellular Detection System (Applied Biosystems).

В целом с помощью способа FMAT более 3000 супернатантов гибридом были идентифицированы как связывающие клетки,

экспрессирующие рецептор для FGF21, но не исходные клетки. Эти супернатанты затем протестировали с помощью функционального анализа на наличие FGF21-подобной активности, как описано ниже.

ПРИМЕР 5

ОТБОР АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ ИНДУЦИРУЮТ FGF21-ПОДОБНЫЙ СИГНАЛЛИНГ

Провели эксперименты с целью идентификации функциональных антител, которые имитируют активность FGF21 дикого типа *(например,* способность индуцировать FGF21-подобный сигналлинг), применяя подходящий способ репортерного анализа FGF21-подобной активности. Раскрытый способ репортерного анализа FGF21-подобной активности позволяет измерять активацию FGFR-сигналлинга посредством определения параметров MAPK-киназного пути. β-Клото – это ко-рецептор, участвующий в FGF21-опосредованном сигналлинге, и хотя ему, как полагают, не присуща собственная способность активировать сигналлинг из-за того, что у него очень короткий цитоплазматический домен, этот белок необходим для того, чтобы FGF21 мог индуцировать сигналлинг через рецепторы FGFR.

Пример 5.1

ELK-люциферазный репортерный анализ

ELK-люциферазный анализ проводили с применением систем рекомбинантных клеток 293T почки человека или клеток CHO. А именно - клетки-хозяева были сконструированы таким образом, чтобы они сверхэкспрессировали β-Клото и репортерные конструкции с геном люциферазы. Репортерные конструкции содержат последовательности, кодирующие GAL4-ELK1 и 5xUAS-Luc, репортерный ген люциферазы под управлением промотора, содержащего пять тандемных копий сайта связывания белка Gal4. Активация комплекса рецептора для FGF21 в этих рекомбинантных репортерных клеточных линиях индуцирует внутриклеточную передачу сигнала, что, в свою очередь, приводит к

фосфорилированию ERK и ELK. Люциферазная активность регулируется уровнем фосфорилированного белка ELK и используется для опосредованного мониторинга и количественного определения активности FGF21.

В одном примере клетки CHO последовательно трансфецировали, используя реагент для трансфекции Lipofectamine 2000 (Invitrogen), согласно протоколу производителя, конструкциями рецептора, экспрессирующими β-Клото, FGFR1c, и репортерными плазмидами: 5xGal4-люцифераза (с минимальным промотором гена тимидинкиназы (TK) с 5 сайтами связывания Gal4 перед геном люциферазы) и Gal4-ELK1. Gal4-ELK1 связывается с сайтами связывания для Gal4 и активирует транскрипцию, когда его фосфорилирует киназа ERK. Транскрипция гена люциферазы и, таким образом, соответствующая ферментативная активность, в данном контексте регулируется уровнем фосфорилированного белка ELK1 и используется для опосредованного мониторинга и количественного определения активности FGF21.

Клон 2E10 выбрали в качестве клеточной линии с репортерным геном люциферазы для анализа активности FGF21 на основании оптимального окна анализа, охватывающего диапазон изменений в 10-20 раз, при использовании нативного FGF21, демонстрирующего EC50 в диапазоне нескольких нМ.

Для проведения этого анализа клетки с ELK-люциферазной репортерной конструкцией наносили на 96-луночные планшеты и культивировали без сыворотки в течение ночи. Добавляли FGF21 или тестируемые пробы на 6 ч при 37°C. После этого планшетам давали остыть до комнатной температуры и измеряли люциферазную активность в клеточных лизатах с помощью Bright-Glo (Promega).

Пример 5.2

Анализ фосфорилирования ERK

Были разработаны альтернативные линии клеток-хозяев, а именно – L6 (линии клеток миобластомы крысы), и применены для идентификации антител со способностью активировать FGF21-

подобный сигналлинг. Линия клеток L6 крысы является желательной линией клеток-хозяев для проведения анализа активности, так как известно, что она экспрессирует минимальные уровни эндогенных рецепторов для FGF. Клетки L6 не отвечают на воздействие FGF21 даже при их трансфекции экспрессионным вектором для β-Клото и, следовательно, обеспечивают отсутствие фонового сигнала. (Kurosu et al., (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 26687-26695).

Клетки L6 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко с добавлением 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота и пенициллина/стрептомицина. Клетки трансфецировали плазмидами, экспрессирующими β-Клото и единичные FGFR, применяя реагент для трансфекции Lipofectamine 2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя.

Анализ FGF-сигналлинга в клетках L6 проводили, как описано в литературе (Kurosu et al., (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 26687-26695). Клеточные культуры собирали через 10 мин. после обработки белком FGF21 или тестируемыми молекулами и подвергали мгновенной заморозке в жидком азоте, гомогенизировали в буфере для лизиса и проводили вестерн-блот анализ с применением антитела против фосфо-p44/42 MAP-киназы (ERK1/2) и антитела против ERK (Cell Signaling). Таким образом определяли процентное содержание фосфорилированного белка ERK относительно суммарного белка ERK.

Кроме того, можно разработать и применять способ количественной оценки фактор-зависимой пролиферации клеток мыши BaF3, часто используемый при изучении цитокиновых рецепторов.

Среди супернатантов гибридом, протестированных на наличие активности FGF21 человека с помощью ELK-люциферазного репортерного анализа на основе клеток CHO (клона 2E10), более 30 были идентифицированы как дающие положительный результат (> 5% от активности FGF21) при сравнении с 20 нМ FGF21 в качестве положительного контроля. Затем антитела очистили от

кондиционированной среды гибридомных культур, показавших положительные результаты, и провели повторное тестирование с помощью ELK-люциферазного репортерного анализа на основе клеток CHO. На фиг. 7 показаны примеры антител, использованных для анализа дозозависимой активности, с расчетной EC50 менее 1 мкг/мл (или 6,7 нМ). Активности подтвердили с помощью анализа фосфорилирования ERK1/2 в клетках L6 (фиг. 8), с EC50 менее 10 нМ, что соответствует данным ELK-люциферазного анализа в клоне 2E10 стабильной клеточной линии CHO.

ПРИМЕР 6

ИНДУКЦИЯ FGF21-ПОДОБНОГО СИГНАЛЛИНГА СПЕЦИФИЧНА В ОТНОШЕНИИ КОМПЛЕКСА FGFR1c/β-КЛОТО

Сообщалось, что FGF21 передает сигнал через множество рецепторных комплексов, включая FGFR1c, 2c, 3c и 4, находящихся в паре с β-Клото. Селективность действия агонистических по отношению к FGF21 антител протестировали в клетках миобластомы крысы L6, трансфецированных векторами, экспрессирующими соответствующие рецепторы FGFR и β-Клото. Результаты, показанные на фиг. 9, демонстрируют, что активность была избирательно опосредована и реализовывалась исключительно через FGFR1c, но не через FGFR2c, 3c или 4, находящиеся в паре с β-Клото, так как активность не наблюдалась в случае перечисленных последними рецепторов при добавлении вплоть до 100 нМ агонистических антител. Эта уникальная избирательность означает, что действие данных антител зависит от β-Клото, но также должно специфично задействовать FGFR1c-компонент сигнального комплекса.

ПРИМЕР 7

АКТИВНОСТЬ В ПЕРВИЧНЫХ АДИПОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

FGF21 стимулирует поглощение глюкозы и липолиз в культивируемых адипоцитах, и предполагается, что адипоциты с

физиологической точки зрения являются более подходящими объектами, чем система рекомбинантных репортерных клеток.

Показано, что панель антител демонстрирует активность, вызывающую фосфорилирование Erk, схожую с FGF21, при анализе адипоцитов человека (фиг. 10), с расчетной EC50 менее 10 нМ.

ПРИМЕР 8

КОНКУРЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ И СОРТИРОВКА АНТИТЕЛ ПО СВЯЗЫВАЕМОМУ ЭПИТОПУ

Для сравнения сходства сайтов связывания для антител на рецепторе для FGF21 провели серию экспериментов по конкурентному связыванию и произвели измерения с помощью Biacore. В одном примере (и как показано на фиг. 11) два взятых для примера агонистических антитела против рецептора для FGF21 (24H11 и 17D8) и одно не обладающее функциональной активностью антитело, связывающееся с рецептором для FGF21 (1A2.1) иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа. Затем иммобилизованными на поверхности антителами были захвачены растворимый комплекс FGFR1c/β-Клото ECD-Fc человека или β-Клото. Наконец, несколько тестируемых антител против рецептора для FGF21 инъецировали по отдельности на область с захваченным растворимым рецептором FGF21 человека или β-Клото. Если инъецируемое антитело узнает сайт связывания, отличный от сайта, узнаваемого иммобилизованным антителом, будет наблюдаться второе связывание. Если антитела узнают очень схожий сайт связывания, дополнительного связывания происходить не будет.

Как видно на фиг. 11A, имеется два различных, хоть и частично перекрывающихся, сайта связывания для протестированных агонистических антител. Один сайт закрывается 24H11, 21H2, 18B11.1 и 17C3 (группа A), а второй сайт закрывается 17D8, 12E4 и 18G1 (группа B). Два нефункциональных антитела, 2G10 и 1A2, связываются с разными сайтами относительно друг друга и относительно двух сайтов, закрываемых агонистическими

антителами из групп A и B. Другие функциональные антитела, связывающиеся с эпитопом группы A, включают 20D4, 22H5, 16H7, 40D2 и 46D11. Этим же способом показано, что два других функциональных антитела, 26H11 и 37D3, связываются с сайтом, закрываемым антителами группы B. Кроме того, третий сайт связывания для функциональных антител был идентифицирован для 39F11, 39F7 и 39G5 (группа C), и он, по-видимому, отличен от сайтов связывания групп A и B (фиг. 11B).

Еще один Biacore-анализ провели с иммобилизацией биотинилированного FGF21 на сенсорном чипе. 10 нМ растворимого β-Клото пропускали через чип отдельно или в смеси с единичными тестируемыми антителами в концентрации 100 нМ. На фиг. 12 видно, что несколько агонистических антител в группе A (24H11, 18B11, 17C3) и антитело 12E4 (из группы B) в существенной степени конкурировали с FGF21 за связывание с растворимым β-Клото, тогда как нефункциональные антитела 2G10 и 1A2 и несколько других функциональных антител не демонстрировали конкуренции с FGF21 за связывание.

На фиг. 11C резюмированы полученные результаты по связыванию.

ПРИМЕР 9

УЗНАВАНИЕ НАТИВНЫХ И ДЕНАТУРИРОВАННЫХ СТРУКТУР

Была исследована способность описываемых антиген-связывающих белков узнавать денатурированные и нативные структуры. Методика и результаты были следующими.

Пример 9.1

Агонистические антитела против рецептора для FGF21 не узнают денатурированные структуры согласно анализу FACS

Лизаты клеток из клеток CHO, стабильно экспрессирующих рецептор для FGF21 (FGFR1c и β-Клото), или из исходных клеток CHO разбавляли буфером для проб без бета-меркаптоэтанола (невосстанавливающие условия). На дорожку 4-20% ПАА гелей с ДСН наносили 20 мкл лизата клеток, и соседние дорожки

разделяли дорожкой с маркерами молекулярных масс. После электрофореза проводили блоттинг гелей на 0,2 мкм нитроцеллюлозные мембраны. Блоты обрабатывали трис-буферным раствором натрия хлорида с Triton-X (TBST) с добавлением 5% обезжиренного молока (блокирующего буфера) в течение 30 мин. После этого блоты разрезали вдоль дорожек с маркерами молекулярных масс. Затем полоски обрабатывали агонистическими антителами против рецептора для FGF21 (12C3, 26H11, 12E4, 21H2, 18B11 или 20D4) и покупными антителами козла против β-Клото мыши и против huFGFR1 (R&D Diagnostics) в буфере TBST с 5% молоком. Блоты инкубировали с антителами в течение одного часа при комнатной температуре, а затем три раза промывали буфером TBST с 1% молоком. После этого блоты обрабатывали вторичными антителами против IgG человека или козла, конъюгированными с HRP, в течение 20 мин. Промывали блоты три раза по 15 мин. буфером TBST и затем обрабатывали проявляющим реагентом Pierce Supersignal West Dura (1 мин.), и экспонировали с рентгеновской пленкой Kodak Biomax.

Покупные антитела против β-Клото и против FGFR1 детектировали соответствующие белки рецептора в ДСН-ПААГ, что свидетельствует о том, что они связываются с денатурированными белками рецептора. В противоположность этому ни одно из протестированных агонистических антител против рецептора для FGF21 не детектировало соответствующие белки, что свидетельствует о том, что они связываются с нативным конформационным эпитопом, в отличие от коммерческих антител, которые связываются с денатурированными последовательностями.

Пример 9.2

Агонистические антитела против рецептора для FGF21 связываются с нативной структурой рецептора согласно анализу FACS

Анализ связывания с помощью FACS проводили для нескольких имеющихся в продаже антител против FGFR1c и β-Клото и

нескольких из раскрытых агонистических антител против рецептора для FGF21. Эксперименты проводили следующим образом. Клетки CHO, стабильно экспрессирующие рецептор для FGF21, обрабатывали приобретенными у компании R&D Systems антителом мыши против huFGFR1, антителом козла против mu-β-Клото или антителами против рецептора для FGF21: 24H11, 17C3, 17D8, 18G1 или 2G10 (1 мкг на $1x10^6$ клеток в 100 мкл PBS/0,5% БСА). Клетки инкубировали с антителами при 4°C, а затем дважды промывали буфером PBS с БСА. Затем клетки обрабатывали меченными FITC вторичными антителами при 4°C с последующими двумя промывками. Клетки ресуспендировали в 1 мл буфера PBS с БСА и анализировали связывание антител с помощью прибора FACS Calibur.

Так же как и в случае результатов вестерн-блота, все протестированные агонистические антитела против рецептора для FGF21 хорошо связываются с рецепторами для FGF21 на поверхности клеток при FACS, тогда как коммерческие антитела против β-Клото или против FGFR1 не связываются. Это наблюдение дополнительно подтверждает, что агонистические антитела против рецептора для FGF21 узнают нативную структуру, тогда как коммерческие антитела к компонентам рецептора не узнают.

ПРИМЕР 10

СКАНИРОВАНИЕ АРГИНИНОМ

Как описано выше, были созданы и охарактеризованы антиген-связывающие белки, которые связываются с FGF21R человека, *например,* FGFR1c, β-Клото или как с FGFR1c, так и с β-Клото. Для определения нейтрализующих детерминант на FGFR1c человека и/или β-Клото, с которыми связываются данные различные антиген-связывающие белки, можно сконструировать ряд мутантных белков FGFR1c и/или β-Клото, содержащих замены на аргинин по выбранным аминокислотным остаткам в составе FGFR1c и/или β-Клото человека. Сканирование аргинином – это признанный в данной области техники способ оценки положений, по которым

антитела или другие антиген-связывающие белки связываются с другим белком, см., *например,* Nanevicz *et al.*, (1995) *J. Biol Chem.*, 270:37, 21619-21625 и Zupnick *et al.*, (2006) *J. Biol Chem.*, 281:29, 20464-20473. В общем случае боковая цепочка аргинина заряжена положительно и имеет относительно большие размеры по сравнению с другими аминокислотами, что может препятствовать связыванию антител с областью антигена, в которую была внесена мутация. Сканирование аргинином – это способ определения того, является ли остаток частью нейтрализующей детерминанты и/или эпитопа.

Различные аминокислоты, распределенные по внеклеточному домену FGFR1c и/или β-Клото человека могут быть выбраны для мутации на аргинин. Выбор может быть сдвинут в направлении заряженных или полярных аминокислот, чтобы максимизировать возможность того, что остаток расположен на поверхности, и снизить вероятность мутации, приводящей к неправильному сворачиванию белка. Применяя стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, можно создать смысловые и антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие мутированные остатки, используя в качестве основы критерии, предложенные в протоколе набора Stratagene Quickchange® II (Stratagene/Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США). Мутагенез последовательностей FGFR1c и/или β-Клото дикого типа (WT) можно осуществить с применением набора Quickchange® II (Stratagene). Можно сконструировать химерные конструкции, которые будут кодировать FLAG-гистидиновую маркер (шесть остатков гистидина (SEQ ID №: 382)) на карбоксильном конце внеклеточного домена, для облегчения очистки с помощью связывания поли-His маркеры.

Для определения нейтрализующих детерминант на FGFR1c и/или β-Клото человека путем анализа дифференциального связывания выбранных для примера моноклональных антител против FGFR1c и/или β-Клото человека с белками FGFR1c и/или β-Клото, несущими мутантные замены на аргинин или дикого типа, можно

проводить мультиплексный анализ с применением рабочей станции и программного обеспечения Bio-Plex (BioRad, Геркулес, Калифорния, США). Ряд покрытых penta-His шариков с различными цветовыми кодами ("penta-His" раскрыта как SEQ ID №: 383) (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США; см. www1.qiagen.com) можно применять для захвата белка с гистидиновым маркером. Шарики с цветовыми кодами позволяют проводить мультиплексный анализ аргининовых мутантных белков FGFR1c и/или β-Клото и белков FGFR1c и/или β-Клото человека дикого типа.

Для приготовления шариков 100 мкл супернатантов с FGFR1c и/или β-Клото дикого типа и с аргининовыми мутантными формами FGFR1c и/или β-Клото, полученных от временно трансфецированной культуры, связывают с покрытыми penta-His шариками ("penta-His" раскрыта как SEQ ID №: 383) в течение ночи при 4°C или в течение 2 ч при комнатной температуре при энергичном встряхивании. Затем шарики промывали согласно протоколу производителя, набор шариков объединяли и наносили в виде аликвот на 2 или 3 колонки в составе 96-луночного планшета для фильтрования (Millipore, Bellerica, Массачусетс, США, продукт № MSBVN1250) для двух или трех повторов анализируемых точек, соответственно. Добавляли в лунки 100 мкл антител против FGFR1c и/или против β-Клото, разведенных в 4 раза, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и промывали. В каждую лунку добавляли 100 мкл разведенных 1:100 антител против IgG Fc человека, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (Jackson Labs., Бар-Харбор, Мэн, США, продукт № 109-116-170), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и промывали. Шарики ресуспендировали в 1% БСА, встряхивая в течение 3 мин., и прочитывали планшет в рабочей станции Bio-Plex. Связывание антитела с аргининовыми мутантными белками FGFR1c и/или β-Клото сравнивают со связыванием антител с FGFR1c и/или β-Клото человека дикого типа из того же объединенного пула. Можно провести титрование антитела в пределах примерно 5 делений по логарифмической

шкале. Медианное значение интенсивности флуоресценции (MFI) для аргининовых мутантных белков FGFR1c и/или β-Клото можно изобразить на графике как процент от максимального сигнала для FGFR1c и/или β-Клото человека дикого типа. Мутанты, для которых сигнал при использовании всех антител ниже порогового значения, *например,* 30% от сигнала для FGFR1c и/или β-Клото дикого типа, можно рассматривать либо как имеющие слишком низкую концентрацию белка на шариках из-за низкого уровня экспрессии во временно трансфецированной культуре, либо как возможно имеющие неправильное сворачивание и их можно исключать из анализа. Мутации *(т.е.* замены на аргинин), которые повышают EC50 моноклональных антител против FGFR1c и/или β-Клото до порогового значения, *например,* делают ее в 3 раза выше (согласно расчетам, например, с помощью GraphPad Prism®), можно рассматривать как обладающие негативным влиянием на связывание моноклональных антител с FGFR1c и/или β-Клото. Посредством этих способов выявлены нейтрализующие детерминанты и эпитопы для различных антител против FGFR1c и/или β-Клото.

ПРИМЕР 11

КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

При еще одном способе определения детерминант активации на FGFR1c и/или β-Клото человека, с которыми связываются эти различные антиген-связывающие белки, специфичные химерные белки FGFR1c и/или β-Клото, принадлежащие одновременно человеку и мыши, могут быть сконструированы, экспрессированы во временно или стабильно трансфецированных клетках 293 или CHO, как описано выше, и протестированы. Например, может быть сконструирован химерный рецептор для FGF21, содержащий нативные FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4 человека, в одном примере – FGFR1c, образующие пару с химерным белком β-Клото человека/мыши, в котором выбранные области или последовательности на β-Клото человека систематически заменены

на соответствующие остатки, характерные для белка мыши (см., *например,* фиг. 2A-2C). Схожим образом нативный β-Клото человека образовывал пару с химерным белком FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c или FGFR4 человека/мыши, в одном примере – FGFR1c, в котором выбранные области или последовательности на FGFR1c человека систематически заменены на соответствующие остатки, характерные для белка мыши (см., *например,* выравнивания на фиг. 1A-1B). Критические последовательности, вовлеченные в связывание и/или активность антиген-связывающих белков, можно выявить с применением способов анализа связывания или измерения активности, описанных в предшествующих примерах 4, 5, 6 и 7, используя в качестве основы химерные рецепторы для FGF21.

Пример 11.1 Конструирование специфичных химерных белков

Химерные белки β-Клото человека/мыши конструировали с применением методологии, описанной в примере 14. Схематическое изображение сконструированных химерных белков приведено на фиг. 29; коротко: полученные химерные белки содержали (от N- к C-концу) последовательность β-Клото человека, сшитую с последовательностью β-Клото мыши, сшитую с последовательностью β-Клото человека. Последовательность β-Клото человека (SEQ ID №: 8) применяли в качестве каркаса, в который вставляли области β-Клото мыши (полноразмерной последовательности, показанной в SEQ ID №: 468). Вставляемые области β-Клото мыши были следующими:

Остатки белка мыши 82P-520P

PKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDF
LGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPLTLQEE
YGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVY
TVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGW
FANPIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVS
LNLRQVLNWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIRVF
GYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLKESTPDM

KGRFP (SEQ ID №:470)

Остатки белка мыши 506F-1043S
FPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRL
KTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGL
KLGVFPMVTLYHPTHSHLGLPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINE
PNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLSLHCDWAEPANPFVD
SHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGT
VDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRKLLAWIRRN
YRDRDIYITANGIDDLALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEEKSKPR
FGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLVEKKPLIFFGCC
FISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID №:471)

Остатки белка мыши 1M-193L
MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRAVTGFSGDGKAIWD
KKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGT
DRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRN
IEPIVTL (SEQ ID №:472)

Остатки белка мыши 82P-302S
PKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDF
LGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPLTLQEE
YGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVY
TVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGS (SEQ ID №:473)

Остатки белка мыши 194Y-416G
YHWDLPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMH
APGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVI
NCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRP
SNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWIKLEYDDPQILISENG (SEQ ID №:474)

Остатки белка мыши 302S-506F
SHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEKEEVRG
TADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKT

EDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKE
RKPKSSAHYYKQIIQDNGF (SEQ ID №:475)

Остатки белка мьши 416G-519P
GWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLF
YVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRF (SEQ ID №:476)

Остатки белка мьши 507P-632G
PLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLK
TRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGLK
LG (SEQ ID №:477)

Остатки белка мьши 520P-735A
PCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIK
KRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGLKLGVFPMVTLYHPT
HSHLGLPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSND
TYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA (SEQ ID №:478)

Остатки белка мьши 632G-849Q
GVFPMVTLYHPTHSHLGLPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINEPN
RLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLSLHCDWAEPANPFVDSH
WKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVD
FYALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFLQ (SEQ ID №:479)

Остатки белка мьши 735A-963S
AVSLSLHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRGL
SSSVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFLQDITRLSSPS
RLAVTPWGVRKLLAWIRRNYRDRDIYITANGIDDLALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDK
VKIKGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSS (SEQ ID №:480)

Остатки белка мьши 1M-81F
MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRAVTGFSGDGKAIWD
KKQYVSPVNPSQLFLYDTF (SEQ ID №:481)

Остатки белка мыши 82P-193L PKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDF LGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTL (SEQ ID №:482)

Химерные белки, полученные с применением последовательностей β-Клото мыши, содержали следующие компоненты:

Название конструкции	SEQ ID № констру к-ции	N-концевые остатки β-Клото человека	Остатки β-Клото мыши	С-концевые остатки β-Клото человека
huBeta_Klotho(1-81, 523-1044)(muBetaKLOTHO 82-520)		1-81	82-520	523-1044
huBeta_Klotho(1-507)(muBetaKLOTHO 506F-1045S)		1-507	506-1043	
huBeta_Klotho(194-1044)(muBetaKLOTHO 1-L193)			1-193	194-1044
huBeta_Klotho(1-81, 303-1044)(muBetaKLOTHO 82P-302S)		1-81	82-302	303-1044
huBeta_Klotho(1-193, 419-1044)(muBetaKLOTHO		1-193	194-416	419-1044

Y194-416G)				
huBeta_Klotho(1-301, 509-1044)(muBetaKLOTHO S302-F506)		1-301	302-506	509-1044
huBeta_Klotho(1-417, 522-1044)(muBetaKLOTHO G416-F519)		1-417	416-519	522-1044
huBeta_Klotho(1-507, 635-1044)(muBeta KLOTHO F06-G632)		1-508	507-632	635-1044
huBeta_Klotho(1-521, 738-1044)(muBeta KLOTHO 520P-735A)		1-521	520-735	738-1044
huBeta_Klotho(1-633, 852-1044)(muBeta KLOTHO 632G-849Q)		1-633	632-849	852-1044
huBeta_Klotho(1-736, 967-1044)(muBeta KLOTHO 735A-963S)		1-736	735-963	967-1044
huBeta_Klotho(82-1044)(muBeta KLOTHO 1-81F)			1-81	82-1044
huBeta_Klotho(1-81, 194-1044)(muBeta KLOTHO 82P-193L)		1-81	82-193	194-1044

Полученные химеры содержали следующие аминокислотные последовательности:

(i) huBeta_Klotho(1-81, 523-1044)(muBetaKLOTHO 82-520)
MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSW
KTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQ
FSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPL
TLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGF
GTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMI
PEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNW
IKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEI
RVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQI
IQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYV
WNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALD
WASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLP
EPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYN
RSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANP
YADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSA
LPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQD
ITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRL
RKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAK
SSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGC
CFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID №:455);

(ii) huBeta_Klotho(1-507)(muBetaKLOTHO 506F-1045S)
MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS

VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHL
YVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFA
LDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGLKLGVFPMVTLYHPTHSHLG
LPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDM
YNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLSLHCDWAEPA
NPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRGLSS
SVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFL
QDITRLSSPSRLAVTPWGVRKLLAWIRRNYRDRDIYITANGIDDLALEDD
QIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFR
AKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLVEKKPLIFF
GCCFISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS
(SEQ ID №:456);

(iii) huBeta_Klotho(194-1044)(muBetaKLOTHO 1-L193)
MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRAV
TGFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSW
KTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQ
FSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPA
NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL

QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:457);

(iv) huBeta_Klotho(1-81, 303-1044)(muBetaKLOTHO 82P-302S)
MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSW
KTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQ
FSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPL
TLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGF
GTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPA
NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL
QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:458);

(v) huBeta_Klotho(1-193, 419-1044)(muBetaKLOTHO Y194-416G)
MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ

FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
TLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGF
GTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMI
PEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNW
IKLEYDDPQILISENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEI
RVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQI
IRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYV
WNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALD
WASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLP
EPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYN
RSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANP
YADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSA
LPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQD
ITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRL
RKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAK
SSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGC
CFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:459);

(vi) huBeta_Klotho(1-301, 509-1044)(muBetaKLOTHO S302-F506)

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMI
PEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNW
IKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEI
RVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQI
IQDNGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYV
WNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALD

WASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLP
EPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYN
RSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANP
YADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSA
LPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQD
ITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRL
RKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAK
SSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGC
CFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:460);

(vii) huBeta_Klotho(1-417, 522-1044)(muBetaKLOTHO G416-F519)

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFD
EIRVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYK
QIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPA
NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL
QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID

№:461);

(viii) huBeta_Klotho(1-507, 635-1044)(muBeta KLOTHO F06-G632)

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHL
YVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFA
LDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPA
NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL
QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID №:462);

(ix) huBeta_Klotho(1-521, 738-1044)(muBeta KLOTHO 520P-735A)

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY

GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHL
YVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFA
LDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGLKLGVFPMVTLYHPTHSHLG
LPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDM
YNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLSLHADWAEPA
NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL
QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:463);

(x) huBeta_Klotho(1-633, 852-1044)(muBeta KLOTHO 632G-849Q)
MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGVFPMVTLYHPTHSHLG
LPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDM
YNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLSLHCDWAEPA

NPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRGLSS
SVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFL
QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:464);

(xi) huBeta_Klotho(1-736, 967-1044)(muBeta KLOTHO 735A-963S)

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHCDWAEPA
NPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRGLSS
SVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFL
QDITRLSSPSRLAVTPWGVRKLLAWIRRNYRDRDIYITANGIDDLALEDD
QIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFR
AKSSVQFYSKLISSSGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:465);

(xii) huBeta_Klotho(82-1044)(muBeta KLOTHO 1-81F)

MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRAV
TGFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPA
NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL
QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:466);

(xiii) huBeta_Klotho(1-81, 194-1044)(muBeta KLOTHO 82P-193L)

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSW
KTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQ
FSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL

NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDQQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPA
NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL
QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
№:467).

Различные антиген-связывающие белки, представленные здесь, а также FGF21 человека протестировали на способность активировать химерные белки в клетках L6. На фиг. 30 представлены наблюдаемые результаты для каждой протестированной молекулы.

Эти данные свидетельствуют, что хотя FGF21 человека был способен активировать FGFR1c, находящийся в сочетании со всеми химерными белками β-Клото человека/мыши (знак "+" указывает наличие активности в отношении рецептора), вставки последовательностей мыши в β-Клото человека повлияли на активность 16H7, 37D3 и 39F7. См. фиг. 30. Эти результаты предполагают, что последовательности β-Клото 1-81, 302-522 и 849-1044 важны для активности агонистических антиген-связывающих белков и могут представлять собой важный эпитоп для их функционирования.

ПРИМЕР 12

АНАЛИЗ ЗАЩИТЫ ОТ ПРОТЕАЗ

Области рецептора для FGF21 человека, с которыми связываются антиген-связывающие белки, связывающиеся с рецептором для FGF21 человека, *например*, FGFR1c, β-Клото или комплексом FGFR1c и β-Клото, можно выявить с применением фрагментации рецептора для FGF21 человека до пептидов специфичными протеазами, *например*, AspN, Lys-C, химотрипсином или трипсином. Можно определить последовательность полученных пептидных фрагментов рецептора для FGF21человека (*т.е.* как содержащих дисульфидные связи, так и не содержащих дисульфидные связи пептидных фрагментов частей, соответствующих FGFR1c и β-Клото). В одном примере растворимые формы рецептора для FGF21 человека, *например*, комплекса, содержащего гетеродимер FGFR1c ECD-Fc и β-Клото ECD-Fc, описанного здесь, можно расщепить протеазой AspN (которая расщепляет связь после остатка аспарагиновой кислоты и некоторых остатков глутаминовой кислоты на амино-конце) путем инкубации примерно 100 мкг растворимого рецептора для FGF21 с концентрацией 1,0 мг/мл в 0,1М фосфата натрия (pH 6,5) в течение 20 ч при 37°C с 2 мкг протеазы AspN.

Затем можно получить пептидный профиль после расщепления протеазой AspN с помощью ВЭЖХ хроматографии, при этом ожидается, что контрольное расщепление схожего количества антитела покажет существенную степень устойчивости к эндопротеазе AspN. Анализ защиты от протеаз можно проводить для определения характеристик протеолитического расщепления рецептора для FGF21 человека в присутствии антиген-связывающих белков. Общий принцип этого анализа заключается в том, что связывание антиген-связывающего белка с рецептором для FGF21 может приводить к защите определенных специфичных сайтов расщепления протеазами, и эта информация может использоваться для определения области или части рецептора для FGF21, с которыми связывается антиген-связывающий белок.

Коротко, полученные после расщепления пептидные фрагменты можно подвергнуть пептидному картированию с помощью ВЭЖХ;

единичные пики собирают и идентифицируют пептиды и строят их карту с применением анализа в реальном времени способом LC-MS с электро-спрей-ионизацией (ESI-LC-MS) и/или с применением N-концевого секвенирования. ВЭЖХ анализ в целях этих исследований можно проводить с применением узкой обращенно-фазовой колонки C18 (Agilent Technologies) для анализа в автономном режиме и с применением капиллярной обращенно-фазовой колонки C18 (The Separation Group) для LC-MS. Пептидное картирование с помощью ВЭЖХ можно проводить с линейным градиентом от 0,05% трифторуксусной кислоты (подвижная фаза A) до 90% ацетонитрила в 0,05% трифторуксусной кислоте. Подвижную фазу можно пропускать через колонки со скоростью потока, необходимой для узкой колонки при ВЭЖХ для анализа LC-MS в автономном режиме или в реальном времени, и для капиллярной колонки при ВЭЖХ для анализа LC-MS в реальном времени.

Анализ последовательности можно провести с помощью LC-MS/MS в реальном времени или с помощью секвенирования по Эдману, используя пептидные пики, выявленные при ВЭЖХ. Анализ ESI LC-MS в реальном времени пептидных фрагментов после расщепления можно проводить для определения точной массы и последовательности пептидов, которые были разделены при ВЭЖХ. Может быть определена подлинность выбранных пептидов, присутствующих в пептидных пиках, полученных при разделении фрагментов, образовавшихся в результате расщепления протеазой.

ПРИМЕР 13

ИССЛЕДОВАНИЯ НА *ЯВАНСКИХ* МАКАКАХ

Конструкцию, кодирующую антиген-связывающий белок, обозначенный здесь как 16H7, получали с помощью методологии, раскрытой в примерах 1-3. 16H7 экспрессировали, очистили и охарактеризовали, как описано в примерах 1-5, и исследовали в системе *in vivo* на страдающих ожирением *яванских* макаках. 16H7 – это полностью принадлежащее человеку антитело IgG1, которое

описывается последовательностями, представленными в таблицах 1-4, *см. выше*.

Пример 13.1

Дизайн исследования

Исследование проводили на страдающих ожирением *яванских* макаках. Возраст обезьян составлял 8-19 лет. Их масса тела находилась в диапазоне от 7 до 14 кг, а индекс массы тела (BMI) – в диапазоне 36-74 кг/м^2. Перед началом введения препарата обезьянам дали время на акклиматизацию – 6 недель. Во время периода акклиматизации обезьян познакомили с процедурами, связанными с исследованием, в том числе с иммобилизацией в кресле, подкожной инъекцией (PBS, 0,1 мл/кг), кормлением через желудочный зонд (вода, 10 мл/кг) и взятием крови для проб, связанных и не связанных с определением переносимости перорального приема глюкозы. Через 4 недели тренировок измерили исходные уровни пробы на переносимость перорального приема глюкозы и метаболических параметров плазмы. 20 обезьян отобрали и рандомизировали в две лечебные группы так, чтобы получить схожие показатели на исходном уровне по массе тела, профилям переносимости перорального приема глюкозы и уровням глюкозы и триглицеридов в плазме.

Исследование проводили в слепом режиме. Носитель (n=10), 16H7 (n=10). Препарат вводили каждые две недели (5 мг/кг). На неделе, когда животным не вводили инъекции с 16H7, им вместо этого вводили инъекции с носителем. После 2 инъекций 16H7 за животными наблюдали в течение еще 6 недель для контроля процессов вымывания препарата и восстановления после лечения. Потребление пищи, массу тела, показатели клинической биохимии и пробы на переносимость перорального приема глюкозы контролировали в течение всего исследования. Потребление пищи измеряли при каждой кормежке. Массу тела измеряли еженедельно. Пробу крови брали в различные дни в состоянии натощак или после еды для измерения уровней глюкозы, инсулина и

триглицеридов. Пробу на переносимость перорального приема глюкозы проводили каждые две недели после начала исследования. День начала лечения обозначен как 0, и подробный план исследования показан на фиг. 14.

Приведенные в данном примере результаты представляют собой данные, собранные в течение 68 дней исследования.

Пример 13.2

Влияние 16H7 на потребление пищи

Животных кормили два раза в день, при этом каждое животное получало 120 г пищи определенного состава, установленного во время периода акклиматизации. Остатки пищи удаляли и взвешивали после каждого кормления, чтобы рассчитать потребление пищи. Время кормления было с 8:00 до 8:30 (±30 мин.) и затем с 16:30 до 17:00 (±30 мин.). Фрукты (150 г) давали каждому животному в течение периода с 11:30 до 12:30 (±30 мин.) каждый день.

По сравнению с носителем 16H7 снижал потребление пищи обезьянами. Эффект снижался и потребление пищи возвращалось на уровень, близкий к показателю исходного уровня или контроля, примерно через 21 день лечения. 16H7 не оказывал существенного влияния на потребление пищи до полудня (фиг. 15) и лишь умеренно снижал потребление пищи после полудня во время лечения (фиг. 16). Повышение потребления пищи до полудня наблюдали после 49 дня (фиг. 15). В течение всего исследования (и даже во время периода акклиматизации) потребление фруктов, по-видимому, было ниже в группе, получавшей 16H7, по сравнению с группой, получавшей носитель. В целом 16H7 продемонстрировал существенное влияние на подавление потребления пищи.

Пример 13.3

Влияние 16H7 на массу тела

Массу тела контролировали еженедельно в течение всего исследования. В течение 4 недель лечения масса тела животных,

которым вводили носитель, оставалась постоянной, тогда как масса тела животных, которым вводили 16H7, прогрессивно снижалась. Масса тела не вернулась к показателю исходного уровня к концу 6-недельного периода вымывания (фиг. 17).

Пример 13.4

Влияние 16H7 на индекс массы тела (BMI), окружность живота (AC) и толщину кожной складки (SFT)

Показатели BMI, AC и SFT контролировали еженедельно в течение всего исследования, как до, так и после введения испытуемого препарата, при измерении массы тела. BMI определяют как массу тела индивидуума, деленную на квадрат его или ее роста. SFT – это толщина двойного слоя кожи и жира под ним, измеренная циркулем. BMI, SFT и AC представляют собой относительно точные, простые и малозатратные измерения, отражающие строение тела, в частности, характеризующие подкожный жир. Животные, которым вводили носитель, демонстрировали относительно стабильные показатели BMI, SFT и AC в течение исследования. Животные, которым вводили 16H7, демонстрировали пониженные уровни значений BMI, AC и SFT в течение 4 недель исследования, что свидетельствует о том, что препарат 16H7 приводит к уменьшению жировой массы. Результаты представлены на фигурах 18-20, соответственно. Эти измеряемые параметры не вернулись обратно к значениям на исходном уровне в конце 6-недельного периода вымывания.

Пример 13.5

Влияние 16H7 на пробу на переносимость перорального приема глюкозы (OGTT)

Пробу на переносимость перорального приема глюкозы (OGTT) проводили до и после начала лечения. Перед инъекциями 16H7 при проведении OGTT были определены значения на исходном уровне для содержания глюкозы и инсулина (фиг. 21 и 22, соответственно), и они не отличались статистически значимо у

групп, которым вводили носитель и 16H7. OGTT после введения дозы препарата проводили каждые две недели в течение периода лечения и после 3 недель периода вымывания. 16H7 незначительно улучшал переносимость глюкозы после 4 недель лечения и 3 недель периода вымывания. Использованная животная модель не является непереносящей глюкозу, что объясняет наблюдаемые незначительные эффекты (фиг. 21). Уровни инсулина были статистически значимо снижены у животных, получавших лечение 16H7 (статистическая значимость наблюдалась для временной точки 0 при проведении OGTT после 2 недель лечения, во временных точках 0 и 15 мин. при проведении OGTT после 4 недель лечения и во временных точках 0 и 60 мин. при проведении OGTT после 2 недель лечения) (фиг. 22).

Пример 13.6

Влияние 16H7 на уровни глюкозы и инсулина натощак и после еды

Кровь брали у животных натощак (после ночи) или после еды (после кормления до полудня). Взятие проб крови натощак проводили еженедельно, через 5 дней после каждой инъекции. Взятие проб крови после еды проводили на 2, 11, 16, 25 и 46 дни после первой инъекции. 16H7 не снижал уровни глюкозы натощак и после еды (фиг. 23 и 25). Гипогликемии у обезьян, которым вводили 16H7, не наблюдалось. Однако, 16H7 приводил к статистически значимому снижению уровней инсулина натощак и после еды (фиг. 24 и 26).

Пример 13.7

Влияние 16H7 на уровни триглицеридов

Измерения проводили в тех же пробах, что брали для измерения уровней глюкозы и инсулина. Уровни триглицеридов были существенно снижены у животных, получавших 16H7, при измерении в условиях натощак и после еды (фиг. 27 и 28).

Пример 13.8

Заключения

В исследовании, проведенном на страдающих ожирением самцах *яванских* макаков, животные, которым вводили 16H7, продемонстрировали улучшенные метаболические характеристики. Масса тела была снижена, и состав тела был улучшен. Наблюдалось кратковременное снижение потребления пищи, но эффект уменьшился и уровень потребления пищи восстановился до показателя исходного уровня или контроля на 21 день исследования. Уровни инсулина и триглицеридов натощак и после еды также были снижены под влиянием 16H7. Кроме того, были улучшены уровни инсулина, определенные во время проведения пробы на переносимость перорального приема глюкозы.

ПРИМЕР 14

ВАРИАНТНЫЕ ФОРМЫ АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ 16H7 И 22H5

В антиген-связывающие белки 16H7 и 22H5, которые описаны здесь в таблицах 1-4, были внесены мутации с целью придания молекуле различных свойств, таких как изменение растворимости, pI, общий заряд, иммуногенность для человека и в животных моделях, стабильность и т.д. Мутации включали вставки, делеции или замены либо в легкой цепи (обозначена "LC", SEQ ID №: 14), либо в тяжелой цепи (обозначена "HC", SEQ ID №: 32) молекулы. Раскрытые единичные точечные мутации вносили по одной или в виде сочетания двух или более мутаций.

Примеры мутаций и сочетаний мутаций, которые вносили в последовательности тяжелой и легкой цепей белка 16H7, включают следующие:

I83K (в тяжелой цепи 16H7) (SEQ ID №: 396)

E16Q (в тяжелой цепи 16H7) + V24F (в тяжелой цепи 16H7) + I83T ((в тяжелой цепи 16H7) + S100I (в тяжелой цепи 16H7) + T119L (в тяжелой цепи 16H7) (SEQ ID №: 395)

D109S (в тяжелой цепи 16H7) (SEQ ID №: 401)

Делеция Y107 (в тяжелой цепи 16H7) (SEQ ID №: 400)

Вставка остатка Y с N-конца от Y107 (в тяжелой цепи 16H7) (SEQ ID №: 405)

D88R + P89A + V90E (в тяжелой цепи 16H7) (SEQ ID №: 398)

D49Y (в легкой цепи 16H7) (SEQ ID №: 386)

D49A (в легкой цепи 16H7) (SEQ ID №: 387)

D91A (в легкой цепи 16H7) (SEQ ID №: 388)

D49A (в легкой цепи 16H7)+ D91A (в легкой цепи 16H7) (SEQ ID №: 389)

Q16K (в легкой цепи 16H7) (SEQ ID №: 385).

Примеры мутаций и сочетаний мутаций, которые вносили в последовательности тяжелой и легкой цепей белка 22H5, включают следующие:

N92Q (в легкой цепи 22H5) (SEQ ID №: 402)

S94A (в легкой цепи 22H5) (SEQ ID №: 403)

C109S (в тяжелой цепи 22H5) (SEQ ID №: 404).

В итоге полученные антиген-связывающие белки содержали следующие пары тяжелых и легких цепей белка 16H7:

(i) легкую цепь 16H7 (SEQ ID №: 14) в паре с тяжелой цепью 16H7, содержащей I83K (SEQ ID №: 396);

(ii) легкую цепь 16H7 (SEQ ID №: 14) в паре с тяжелой цепью 16H7, содержащей E16Q, V24F, I83T, S100I, T119L (SEQ ID №: 395);

(iii) легкую цепь 16H7 (SEQ ID №: 14) в паре с тяжелой цепью 16H7, содержащей D109S (SEQ ID №: 401);

(iv) легкую цепь 16H7 (SEQ ID №: 14) в паре с тяжелой цепью 16H7, содержащей делецию Y107 (SEQ ID №: 400);

(v) легкую цепь 16H7 (SEQ ID №: 14) в паре с тяжелой цепью 16H7, содержащей вставку Y с N-конца от Y107 (SEQ ID №: 405);

(vi) легкую цепь 16H7 (SEQ ID №: 14) в паре с тяжелой цепью 16H7, содержащей D88R, P89A, V90E (SEQ ID №: 398);

(vii) тяжелую цепь 16H7 (SEQ ID №: 32) в паре с легкой цепью 16H7, содержащей D49Y (SEQ ID №: 386);

(viii) тяжелую цепь 16H7 (SEQ ID №: 32) в паре с легкой цепью 16H7, содержащей D49A (LC) (SEQ ID №: 387);
(xi) тяжелую цепь 16H7 (SEQ ID №: 32) в паре с легкой цепью 16H7, содержащей D91A (SEQ ID №: 388);
(ix) тяжелую цепь 16H7 (SEQ ID №: 32) в паре с легкой цепью 16H7, содержащей D49A, D91A (SEQ ID №: 389);
(x) тяжелую цепь 16H7 (SEQ ID №: 32) в паре с легкой цепью 16H7, содержащей Q16K (LC) (SEQ ID №: 385);

и следующие пары последовательностей тяжелой и легкой цепей белка 22H5:
(xi) тяжелую цепь 22H5 (SEQ ID №: 31) в паре с легкой цепью 22H5, содержащей N92Q (LC) (SEQ ID №: 402);
(xii) тяжелую цепь 22H5 (SEQ ID №: 31) в паре с легкой цепью 22H5, содержащей S94A (LC) (SEQ ID №: 403);
(xiii) легкую цепь 22H5 (SEQ ID №: 13) в паре с тяжелой цепью 22H5, содержащей C109S (HC) (SEQ ID №: 404);
(xiv) легкую цепь 22H5 (SEQ ID №: 13) в паре с тяжелой цепью 22H5, содержащей вставку остатка тирозина в положении 107 (SEQ ID №: 405).

Аминокислотные последовательности полученных вариантов легких цепей показаны в таблице 6:

Таблица 6A

Аминокислотные последовательности вариантов белков 16H7 и 22H5

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNN IGSESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTK LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNN IGSESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTK LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	386
Легкая цепь 16H7	D49A	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNN IGSESVHWYQQKPGQAPVLVVY**A**DSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTK LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL	387

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
				TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNN IGSESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTK LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNN IGSESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTK LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D91A	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNN IGSESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVW**A**GNSDHVVFGGGTK LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	388
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49A + D91A	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYADSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWAGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	389
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Тяжелая цепь 16H7	V24F	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCT**F**SGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIM TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	390

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Тяжелая цепь 16H7	I83T	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	391
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Тяжелая цепь 16H7	V24F + I83T	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCT**F**SGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVL**T**M TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	392

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Тяжелая цепь 16H7	E16Q +V24F +I83T	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTQTLTLTCTFSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	393

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**D**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVW**D**GNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**Q**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVW**D**GNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
				VTHEGSTVEKTVAPTECS	
Тяжелая цепь 16H7	E16Q +V24F +I83T +T119L	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTQTLTLTCTFSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMD VWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	394

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNI GSESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD EADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVL GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVE TTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNI GSESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD EADYYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVL GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVE TTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Тяжелая цепь 16H7	E16Q +V24F +I83T +S100I+T119L	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTQTLTLTCTFSGF SLNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIF SNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVV LTMTNMDPVDTATYYCARIVVTGGYYY DGMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	395
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Тяжелая цепь 16H7	I83K	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVL**K**M TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	396

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Тяжелая цепь 16H7	S100I	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIM TNMDPVDTATYYCARIVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	397
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Тяжелая цепь 16H7	D88R +P89A +V90E	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIM TNM**RAE**DTATYYCARSVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	398

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Тяжелая цепь 16H7	D88R +P89A +V90E+S100I	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIM TNM**RAE**DTATYYCARIVVTGGYYYDGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	399
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Тяжелая цепь 16H7	Делеция Y107	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIM TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYDGMDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	400

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Тяжелая цепь 16H7	D109S	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIM TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYSGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	401
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Легкая цепь 22H5	N92Q	H2	31	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SQSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWD**Q**TSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	402
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Легкая цепь 22H5	S94A	H2	31	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SQSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDNT**A**DHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	403
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386
Тяжелая цепь 22H5	C109S	L2	13	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVDTATYYCARILLVGAYYY**S**GMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	404

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPG**K**TARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	385
Легкая цепь 16H7	D49Y	H3	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SESVHWYQQKPGQAPVLVVY**Y**DSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDGNSDHVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	386

сердцевинная коровая последователь-ность	Изменение	В паре с	SEQ ID № парной Последовательно-сти	Аминокислотная последовате-льность вариантной цепи	SEQ ID №:
Тяжелая цепь 16H7	Вста вка Y107	L3	14	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFS LNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN DEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIM TNMDPVDTATYYCARSVVTGGYYYYDGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	405

Таблица 6B

Нуклеотидные последовательности вариантов 16H7 и 22H5

Коровая последовательность	Изменение	Последователь-ность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
Легкая цепь 16H7	Q16K	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT GGCCCCAGGA**AAG**ACGGCCAGGATTACCTGTGGGG GAAACAACATTGGAAGTGAAAGTGTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGT CTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATGGTAATA GTGACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAG CCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGC ATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT ACAGAATGTTCA	406
Легкая цепь 16H7	D49Y	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT GGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGG GAAACAACATTGGAAGTGAAAGTGTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGT CTAT**TAT**GATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATGGTAATA GTGACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG	407

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		ACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAG CCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGC ATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT ACAGAATGTTCA	
Легкая цепь 16H7	D49A	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT GGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGG GAAACAACATTGGAAGTGAAAGTGTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGT CTATGCTGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATGGTAATA GTGACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAG CCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGC ATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT	408

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		ACAGAATGTTCA	
Легкая цепь 16H7	D91A	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT GGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGG GAAACAACATTGGAAGTGAAAGTGTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGT CTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGG**GCT**GGTAATA GTGACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAG CCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC	409

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGC ATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT ACAGAATGTTCA	
Легкая цепь 16H7	D49A+D91A	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT GGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGG GAAACAACATTGGAAGTGAAAGTGTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGT CTAT**GCT**GATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGG**GCT**GGTAATA GTGACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAG CCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGC ATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT ACAGAATGTTCA	410
Тяжелая цепь	V24F	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCT	411

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
16H7		TCTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AATTATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG	

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	I83T	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT	412

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	V24F+I83T	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCT TCTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA	413

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC	
		TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG	
		GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG	
		GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG	
		AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT	
		GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT	
		CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC	
		ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA	
		CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA	
		ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT	
		CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT	
		TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC	
		CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC	
		TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC	
		CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG	
		TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG	
		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC	
		AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC	
		GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC	
		TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC	
		CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA	
		TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG	
		GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC	
		CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG	
		GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG	
		AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC	
		ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC	
		TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG	

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+V24F+I83T	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCT TCTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG	414

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+V24F+I83T+T119L	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCT TCTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCCTGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT	415

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь	E16Q+V24F+I83T+S1	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCT	416

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
16H7	00I+T119L	TCTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT	
		GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT	
		GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA	
		AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC	
		ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT	
		AACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA	
		CATATTACTGTGCACGGATCGTAGTAACTGGCGGC	
		TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG	
		GACCCTGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG	
		GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG	
		AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT	
		GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT	
		CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC	
		ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA	
		CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA	
		ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT	
		CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT	
		TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC	
		CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC	
		TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC	
		CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG	
		TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG	
		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC	
		AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC	
		GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC	
		TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC	
		CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA	
		TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG	

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	I83K	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AAAGATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT	417

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	S100I	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AATTATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA	418

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		CATATTACTGTGCACGGATCGTAGTAACTGGCGGC	
		TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG	
		GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG	
		GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG	
		AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT	
		GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT	
		CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC	
		ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA	
		CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA	
		ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT	
		CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT	
		TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC	
		CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC	
		TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC	
		CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG	
		TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG	
		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC	
		AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC	
		GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC	
		TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC	
		CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA	
		TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG	
		GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC	
		CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG	
		GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG	
		AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC	
		ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC	
		TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG	

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	D88R+P89A+V90E	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AATTATGACCAACATGAGAGCTGAGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC	419

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	D88R+P89**A**+V90E**+S**100I	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AATTATGACCAACATGAGAGCTGAGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGATCGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT	420

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	Делеция Y107	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT	421

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT	
		GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA	
		AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC	
		ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT	
		AATTATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA	
		CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC	
		TAC|TACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA	
		CCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGGGC	
		CCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG	
		CACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG	
		TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG	
		TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACAC	
		CTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT	
		CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAAC	
		TTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA	
		CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTG	
		AGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCA	
		GCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTT	
		CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC	
		GGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG	
		AGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTA	
		CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA	
		AGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT	
		GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTG	
		GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA	
		ACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC	
		TCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT	
		GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA	

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACAC CTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	D109S	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AATTATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TACTACTACAGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC	422

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
Легкая цепь 22H5	N92Q	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT GGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGG GAAACAACATTGGAAGTCAAAGTGTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTCCTGGTCGT CTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGTTCCAACTCTGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAT**CAG**ACTA GTGATCATGTGGTATTCGGCGGGGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAG CCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGC ATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT ACAGAATGTTCA	423

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
Легкая цепь 22H5	S94A	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT GGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGG GAAACAACATTGGAAGTCAAAGTGTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTCCTGGTCGT CTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGTTCCAACTCTGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAATACT**G** **CT**GATCATGTGGTATTCGGCGGGGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAG CCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTG GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGC ATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT ACAGAATGTTCA	424
Тяжелая цепь 22H5	C109S	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAGCAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT TACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGATATTATTAGTGGGAGCT	425

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		TACTACTACAGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG	
		GACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGG	
		GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG	
		AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT	
		GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT	
		CGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC	
		ACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA	
		CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA	
		ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT	
		CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT	
		TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC	
		CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTC	
		TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC	
		CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG	
		TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG	
		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC	
		AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC	
		GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC	
		TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC	
		CAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA	
		TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG	
		GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC	
		CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG	
		GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG	
		AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC	
		ACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC	
		TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG	
		CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA	

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Тяжелая цепь 16H7	Вставка Y107	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGT GAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCG TGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGT GTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAA AATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCT AATTATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCA CATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTAACTGGCGGC TAC**TAT**TACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCC AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAC AGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGT GCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC	426

Коровая последовательность	Изменение	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID №:
		CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGT TCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	

Таблица 6C

Аминокислотные последовательности областей CDR вариантных белков

Коровая последо-вательность	Измене ние	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
Легкая цепь 16H7	Q16K	FW	GGNNIGSESVH	166	DDSDRPS	176	QVWDGNSDHVV	188
Легкая цепь 16H7	D49Y	CDR2	GGNNIGSESVH	166	**Y**DSDRPS	427	QVWDGNSDHVV	188
Легкая цепь 16H7	D49A	CDR2	GGNNIGSESVH	166	**A**DSDRPS	428	QVWDGNSDHVV	188
Легкая цепь 16H7	D91A	CDR3	GGNNIGSESVH	166	DDSDRPS	176	QVW**A**GNSDHVV	429
Легкая цепь 16H7	D49A+ D91A	CDR2, CDR3	GGNNIGSESVH	166	**A**DSDRPS	427	QVW**A**GNSDHVV	430
Тяжелая цепь 16H7	V24F	FW	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYDGMDV	148
Тяжелая цепь 16H7	I83T	FW	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYDGMDV	148
Тяжелая цепь 16H7	V24F+I83T	FW	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYDGMDV	148
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+ V24F+I83T	FW	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYDGMDV	148

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+V24F+I83T+T119L	FW	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYDGMDV	148
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+V24F+I83T+S100I+T119L	FW, CDR3	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	IVVTGGYYYDGMDV	431
Тяжелая цепь 16H7	I83K	FW	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYDGMDV	148
Тяжелая цепь 16H7	S100I	CDR3	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	IVVTGGYYYDGMDV	432
Тяжелая цепь 16H7	D88R+P89A+V90E	FW	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYDGMDV	148
Тяжелая цепь 16H7	D88R+P89A+V90E+S100I	FW, CDR3	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	IVVTGGYYYDGMDV	433
Тяжелая цепь 16H7	Делеция Y107	CDR3	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYDGMDV	434

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
Тяжелая цепь 16H7	D109S	CDR3	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYSGMDV	435
Легкая цепь 22H5	N92Q	CDR3	GGNNIGSQSVH	167	DDSDRPS	176	QVWDQTSDHVV	436
Легкая цепь 22H5	S94A	CDR3	GGNNIGSQSVH	167	DDSDRPS	176	QVWDNTADHVV	437
Тяжелая цепь 22H5	C109S	CDR3	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	ILLVGAYYYSGMDV	438
Тяжелая цепь 16H7	Вставка Y107	CDR3	NARMGVS	122	HIFSNDEKSYSTSLKS	133	SVVTGGYYYYDGMDV	439

Таблица 6D

Нуклеотидные последовательности для областей CDR вариантных белков

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
Легкая цепь 16H7	Q16K	FW	GGGGGA AACAAC ATTGGA AGTGAA AGTG TGCAC	239	GATGAT AGCGAC CGGCCC TCA	249	CAGGTGTG GGATGGTA ATAGTGAT CATGTGGT A	260
Легкая цепь 16H7	D49Y	CDR2	GGGGGA AACAAC ATTGGA AGTGAA AGTG TGCAC	239	**TAT**GAT AGCGAC CGGCCC TCA	442	CAGGTGTG GGATGGTA ATAGTGAT CATGTGGT A	260
Легкая цепь 16H7	D49A	CDR2	GGGGGA AACAAC ATTGGA AGTGAA AGTG TGCAC	239	**GCT**GAT AGCGAC CGGCCC TCA	443	CAGGTGTG GGATGGTA ATAGTGAT CATGTGGT A	260
Легкая цепь 16H7	D91A	CDR3	GGGGGA AACAAC ATTGGA AGTGAA AGTG TGCAC	239	GATGAT AGCGAC CGGCCC TCA	249	CAGGTGTG G**GCT**GGTA ATAGTGAC CATGTGGT A	445
Легкая цепь 16H7	D49A+ D91A	CDR2, CDR3	GGGGGA AACAAC ATTGGA AGTGAA AGTG	239	**GCT**GAT AGCGAC CGGCCC TCA	444	CAGGTGTG G**GCT**GGTA ATAGTGAC CATGTGGT A	445

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
			TGCAC					
Тяжелая цепь 16H7	V24F	FW	AATGCT AGAATG GGTGTG AGC	196	CACATT TTTTCG AATGAC GAAAAA TCCTAC AGCACA TCTCTG AAGAGC	206	TCAGTAGT AACTGGCG GCTACTAC TACGACGG TATGGACG TC	221
Тяжелая цепь 16H7	I83T	FW	AATGCT AGAATG GGTGTG AGC	196	CACATT TTTTCG AATGAC GAAAAA TCCTAC AGCACA TCTCTG AAGAGC	206	TCAGTAGT AACTGGCG GCTACTAC TACGACGG TATGGACG TC	221
Тяжелая цепь 16H7	V24F+I 83T	FW	AATGCT AGAATG GGTGTG AGC	196	CACATT TTTTCG AATGAC GAAAAA TCCTAC AGCACA TCTCTG AAGAGC	206	TCAGTAGT AACTGGCG GCTACTAC TACGACGG TATGGACG TC	221

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+V24F+I83T	FW	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	TCAGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTC	221
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+V24F+I83T+T119L	FW	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	TCAGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTC	221
Тяжелая цепь 16H7	E16Q+V24F+I83T+S100I+T119L	FW, CDR3	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	ATCGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTC	446

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
Тяжелая цепь 16H7	I83K	FW	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	TCAGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTC	221
Тяжелая цепь 16H7	S100I	CDR3	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	ATCGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTC	446
Тяжелая цепь 16H7	D88R+P89A+V90E	FW	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	TCAGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTC	221

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
Тяжелая цепь 16H7	D88R+P89A+V90E+S100I	FW, CDR3	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	ATCGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTC	446
Тяжелая цепь 16H7	Делеция Y107	CDR3	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	TCAGTAGTAACTGGCGGCTACTACGACGGTATGGACGTC	447
Тяжелая цепь 16H7	D109S	CDR3	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	TCAGTAGTAACTGGCGGCTACTACTACAGCGGTATGGACGTC	448
Легкая цепь 22H5	N92Q	CDR3	GGGGGAAACAACATTGGAAGTCAAAGTG	240	GATGATAGCGACCGGCCCTCA	249	CAGGTGTGGGATCAGACTAGTGATCATGTGGTA	449

Коровая последо-вательность	Изменение	Распо-ложение мутации	CDR1	CDR1 SEQ ID №	CDR2	CDR2 SEQ ID №	CDR3	CDR3 SEQ ID №
			TGCAC					
Легкая цепь 22H5	S94A	CDR3	GGGGGAAACAACATTGGAAGTCAAAGTGTGCAC	240	GATGATAGCGACCGGCCCTCA	249	CAGGTGTGGGATAATACT**GCT**GATCATGTGGTA	450
Тяжелая цепь 22H5	C109S	CDR3	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	ATATTATTAGTGGGAGCTTACTACTAC**AGC**GGTATGGACGTC	451
Тяжелая цепь 16H7	Вставка Y107	CDR3	AATGCTAGAATGGGTGTGAGC	196	CACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGC	206	TCAGTAGTAACTGGCGGCTAC**TAT**TACTACGACGGTATGGACGTC	452

Дополнительно было получено и исследовано "полуантитело". Эта структура содержит легкую цепь 16H7 (L3; SEQ ID №: 50),

которая образовывала пару со сконструированной формой тяжелой цепи 16H7; сконструированная тяжелая цепь содержала тяжелую цепь 16H7 (SEQ ID №: 32), соединенную через линкер $(G_4S)_8$ (SEQ ID №: 440) с последовательностью IgG2 Fc (SEQ ID №: 441), которая образовывала пару с последовательностью Fc в составе тяжелой цепи 16H7. Части, соответствующие компонентам полуантитела, имеют следующие последовательности:

Тяжелая цепь 16H7

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLNNARMGVSWIR
QPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIMTNMDPVDTATYYCARSVV
TGGYYYDGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS
SVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID №:32),

Линкер

GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID №:440),

IgG2 Fc

ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID №:441).

Полноразмерная тяжелая цепь полуантитела имела аминокислотную последовательность, приведенную ниже:

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLNNARMGVSWIR
QPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLIMTNMDPVDTATYYCARSVV
TGGYYYDGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS
SVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH

NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID №:453),

которая кодируется следующей последовательностью:
ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTGTGGCTGAGAGGTGCGCG
CTGTCAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGC
TGACCTGCACCGTGTCTGGGTTCTCACTCAACAATGCTAGAATGGGTGTGAGCTGGATCCGT
CAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTA
CAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCC
TAATTATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGTCAGTAGTA
ACTGGCGGCTACTACTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
TAGTGCCAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCG
AGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCT
TGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG
CCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCCAGCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACA
CCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTGGAGCGGAAGTCC
AGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCC
CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG
ACGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGGTGGAGGTGCAC
AACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTCCT
CACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGG
GCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCTCAG
GTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCT
CGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGA
ACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAA
CTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTAGCGTGATGCACGA
GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCGGAGGCGGAGGAT
CTGGCGGCGGAGGAAGTGGAGGGGGCGGATCTGGTGGTGGAGGCAGCGGCGGAGGTGGAAGT

GGCGGTGGAGGATCCGGTGGAGGCGGCTCAGGTGGCGGCGGAAGCGAGAGAAAGTCCTCCGT
GGAGTGTCCACCATGCCCTGCTCCACCAGTGGCTGGCCCTTCCGTCTTTCTCTTTCCACCTA
AACCTAAGGATACACTCATGATCTCCAGAACTCCAGAGGTCACATGTGTGGTCGTCGATGTC
AGTCATGAGGATCCTGAAGTCCAGTTTAACTGGTATGTGGATGGCGTCGAAGTCCATAATGC
TAAGACAAAACCTCGCGAAGAACAGTTTAACTCCACCTTTAGAGTCGTGAGCGTGCTGACAG
TCGTCCATCAGGATTGGCTCAATGGGAAAGAATACAAATGTAAAGTCTCTAACAAAGGACTG
CCCGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAAACAAAGGGGCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTCTA
CACACTCCCACCCTCCAGAGAAGAGATGACAAAAAATCAGGTGTCACTCACCTGTCTGGTCA
AGGGGTTTTACCCCTCCGACATTGCCGTGGAATGGGAATCCAATGGGCAGCCTGAAAACAAT
TATAAGACTACACCTCCTATGCTCGACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTCTACTCTAAACTCAC
AGTGGATAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAATGTCTTTTCCTGCTCCGTCATGCATGAAGCTC
TCCACAATCATTATACACAGAAGTCTTTGTCCCTGTCCCCCGGCAAG (SEQ ID
№:454).

Пример 14.1

Исследование связывания β-Клото сконструированными антителами способом ELISA

Сконструированные генно-инженерными способами формы 16H7 и 22H5 протестировали на связывание с β-Клото с помощью анализа ELISA. Условия проведения ELISA были следующими.

Покрытые стрептавидином планшеты Maxisorp инкубировали с 2 мкг/мл β-Клото в течение ночи при 4°C. Антитела добавляли в виде серии 3-кратных разведений, начиная с 1 мкМ, для инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. Конъюгированное с HRP антитело против Fc человека применяли в качестве детектирующего антитела. Сигнал проявляли с применением Lumiglo и прочитывали на Envision.

Результаты анализа ELISA приведены на фиг. 32A-32C и свидетельствуют, что большинство вариантов 16H7 связывались с β-Клото человека, за исключением мутантной формы, несущей вставку тирозина в положении 107.

Пример 14.2

Созданные генно-инженерными способами варианты 16H7 и 22H5 связываются с нативной структурой рецептора согласно данным FACS

Анализ связывания с применением FACS проводили в отношении нескольких созданных генно-инженерными способами форм 16H7 и 22H5. Эксперименты проводили следующим образом.

Клетки CHO, стабильно экспрессирующие рецептор для FGF21, обрабатывали исходным антителом 16H7 и 22H5, а также созданными генно-инженерными способами их вариантами (1 мкг на $1x10^6$ клеток в 100 мкл PBS/0,5% БСА). Клетки инкубировали с антителами при 4°C, а затем дважды промывали буфером PBS с БСА. Затем клетки обрабатывали меченными FITC вторичными антителами при 4°C с последующими двумя промывками. Клетки ресуспендировали в 1 мл буфера PBS с БСА и анализировали связывание антител с помощью прибора FACS Calibur.

Так же как и по результатам анализа ELISA, большинство протестированных созданных генно-инженерными способами вариантов агонистических антител против рецептора для FGF21 хорошо связываются с рецептором для FGF21 на поверхности клетки при FACS. Это наблюдение дополнительно подтвердило, что направленное конструирование агонистических антител против рецептора для FGF21 сохраняет связывание с нативной структурой. В случае одной мутантной формы, в которой область CDR3 была сконструирована так, чтобы она содержала тирозин в положении Y107, наблюдалась полная потеря способности связываться с рецептором на поверхности клетки, что схоже с результатами анализа ELISA. Это наблюдение указывает на роль петли CDR3 в связывании с нативной конформацией.

Пример 14.3

Активность вариантов 16H7 и 22H5 в первичных адипоцитах человека

FGF21 стимулирует поглощение глюкозы и липолиз у культивируемых адипоцитов, и, следовательно, адипоциты часто

рассматривают как пригодный с физиологической точки зрения объект для проведения анализа. Показано, что панель созданных генно-инженерными способами вариантов 16H7 и 22H5 демонстрирует активность, приводящую к фосфорилированию Erk, подобно FGF21, при анализе с применением адипоцитов человека, с расчетной EC50 менее 10 нМ, как указано в таблице 7.

Таблица 7

Активность вариантов при анализе с применением адипоцитов человека

Коровая последовательность	**SEQ ID № вариантной цепи**	**Вариант**	**EC50 (нМ)**
Тяжелая цепь 16H7	391	I83T	0,73
Тяжелая цепь 16H7	393	E16Q+V24F+I83T	0,38
Тяжелая цепь 16H7	398	D88R+P89A+V90E	0,35
Тяжелая цепь 16H7	394	E16Q+V24F+I83T+T119L	0,36
		16H7 (дик. тип)	0,53
Легкая цепь 22H5	403	S94A	1,98
Легкая цепь 22H5	402	N92Q	3,33
Тяжелая цепь 16H7	400	Делеция Y107	1,04
Тяжелая цепь 16H7	396	I83K	0,39
Тяжелая цепь 16H7	397	S100I	0,17

Тяжелая цепь 16H7	401	D109S	0,31
Тяжелая цепь 16H7	399	D88R+P89A+V90E+S100I	0,14
Тяжелая цепь 16H7	395	E16Q+V24F+I83T+S100I +T119L	0,24
Тяжелая цепь 22H5	405	Вставка Y107	0,51
Тяжелая цепь 16H7	390	V24F	0,75
Тяжелая цепь 16H7	392	V24F+I83T	0,37
Легкая цепь 16H7	386	D49Y	0,60
Легкая цепь 16H7	387	D49A	0,63
Легкая цепь 16H7	389	D49A, D91A	1,4
Легкая цепь 16H7	388	D91A	1,3
Легкая цепь 16H7	385	Q16K	0,11
		22H5 (дик. тип)	2,27

Пример 14.4

Эксперименты по связыванию с применением Biacore и измерение скорости диссоциации

Связывание вариантов 16H7 и 22H5 с β-Клото человека протестировали с применением анализа Biacore. Коротко, антитело мыши против гистидинового маркера (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США) иммобилизовали на чипе CM5 с помощью реагентов, связывающих аминогруппы (General Electronics, Пискатауай, Нью-Джерси, США). Содержащий His-маркер

рекомбинантный белок β-Клото человека иммобилизовали во второй проточной ячейке до достижения плотности примерно 100 RU. Первую проточную ячейку использовали для контроля фонового сигнала. 100 нМ моноклональные антитела разводили в PBS с 0,1 мг/мл БСА, 0,005% P20 и вводили в пространство над β-Клото, захваченным на поверхности, покрытой антителом против гистидинового маркера. Для кинетических измерений 0,78~100 нМ моноклональные антитела разводили в PBS с 0,1 мг/мл БСА, 0,005% P20 и вводили в пространство над поверхностью с β-Клото.

Протестированные варианты резюмированы в таблице 8:

Таблица 8

Варианты, изученные в экспериментах по связыванию и определению скорости диссоциации

Номер конструкции	**Коро-вый анти-ген-связы-вающий белок**	**Идентификатор тяжелой цепи/ Изменение**	**Идентификатор легкой цепи/ Изменение**	**SEQ ID № тяже-лой цепи**	**SEQ ID № легкой цепи**
22H5		H2	L2	31	13
№1, P60881.3	16H7	I83T	L3	391	14
№2, P60880.3	16H7	E16Q+V24F+I83T	L3	393	14
№3, P60890.3	16H7	D88R+P89A+V90E	L3	398	14
№4, P60878.3	16H7	E16Q+V24F+I83T + T119L	L3	394	14
№5, 16H7 (дик. тип)	16H7	H3	L3	32	14

№6, P60898.3	22H5	H2	S94A	31	403
№7, P60897.3	22H5	H2	N92Q	31	402
№8, P60886.3	16H7	Делеция Y107	L3	400	14
№9, P60885.3	16H7	I83K	L3	396	14
№10, P60884.3	16H7	S100I	L3	397	14
№11, P60883.3	16H7	D109S	L3	401	14
№12, P60879.3	16H7	D88R+P89A+V90E +S100I	L3	399	14
№13,P60882 .3	16H7	Тяжелая цепь полуантитела	L3	453	14
№14, P60891.3	16H7	E16Q+V24F+I83T + S100I+T119L	L3	395	14
№15,P60889 .3	16H7	Вставка Y107	L3	405	14
№16, P60888.3	16H7	V24F	L3	390	14
№17, P60887.3	16H7	V24F+I83T	L3	392	14
№18,P60894 .3	16H7	H3	D49Y	32	386
№19, P60895.3	16H7	H3	D49A	32	387
№20, P60893.3	16H7	H3	D49A+D91A	32	389
№21, P60892.3	16H7	H3	D91A	32	388

№22, P60896.3	16H7	H3	Q16K	32	385
№23, P60899.2	22H5	C109S	L2	404	13

Среди протестированных созданных генно-инженерными способами моноклональных антител большая часть продемонстрировала прочное связывание с β-Клото человека, за исключением №15, которое не продемонстрировало связывания. В приведенной ниже таблице 9 показано связывание 100 нМ моноклональных антител с β-Клото, захваченным антителами против гистидинового маркера. На фиг. 33 показано сравнение скоростей диссоциации.

Таблица 9

Связывание с β-Клото

Проба	$k_{дис.}$ (1/с)
№20, P60893.3	1,9E-04
№11, P60883.3	2,6E-04
№23, P60899.2	3,0E-04
22H5	3,1E-04
№18, P60894.3	3,1E-04
№6, P60898.3	3,5E-04
№13, P60882.3	4,4E-04
№7, P60897.3	5,2E-04
№8, P60886.3	5,3E-04

ПРИМЕР 15

Сочетания антиген-связывающих белков демонстрируют аддитивный эффект

Были отобраны антиген-связывающие белки, представляющие различные группы (фиг. 11a и b), и протестированы в парах с помощью репортерного анализа для определения того, будет ли

пара молекул демонстрировать аддитивный эффект. Анализ проводили следующим образом.

В первый день клон AM-1/D FGFR1c+β-Клото Luc посеяли в 96-луночный планшет в количестве 20 тыс. клеток на лунку в среде DMEM + 10% FBS. Планшет инкубировали в течение ночи. На следующий день среду заменяли средой для проведения анализа (DMEM + 0,2% FBS) и инкубировали в течение ночи. Используя рабочий исходный раствор антител (1 мг/мл в PBS), приготовили каждое исследуемое антитело в виде разведения до концентрации 2 мкг/мл в среде для проведения анализа. 100 мкл каждого предназначенного для тестирования антитела объединили в планшете с лунками с U-образным дном. От клеток отбирали среду для проведения анализа и переносили 50 мкл смесей антител. Смеси антител инкубировали над клетками в течение 5 ч. Наконец, сигнал в каждой пробе прочитывали с применением реагента SteadyGlo Luciferase (50 мкл/лунку) согласно рекомендациям производителя.

В приведенной ниже таблице 10 резюмированы данные по активности (% активности FGF21 согласно данным репортерного анализа), наблюдаемой во время исследования; в таблице 11 приведен обзор активностей в зависимости от групп антител.

Таблица 10

Активность сочетаний антител (%)

		Изотип	6	5	4	3	2	1
		IgG2k	2G10	16H7	12E4.1	20D4.1	39F7	26H11.1
Изотип	IgG2k	Не определяли	-1,1	23,5	25,4	12,5	9,2	17,9
1	26H11.1	17,9	19,1	36,7	21,4	28,3	20,7	
2	39F7	9,2	9,1	37,0	30,8	21,4		

3	20D4.1	12,5	13,5	19,4	32,0			
4	12E4.1	25,4	28,8	41,5				
5	16H7	23,5	27,8					
6	2G10	-1,1						

Таблица 11

Комбинации антител, составленные на основе групп

			D	C	B	B	A	A
Группа	**ID антитела**	**Изотип**	**2G10**	**39F7**	**12E4.1**	**26H11.1**	**16H7**	**20D4.1**
A	**20D4.1**	12,5	13,5	21,4	32,0	28,3	19,4	
A	**16H7**	23,5	27,8	37,0	41,5	36,7		
B	**26H11.1**	17,9	19,1	20,7	21,4			
B	**12E4.1**	25,4	28,8	30,8				
C	**39F7**	9,2	9,1					
D	**2G10**	-1,1						

Интересно отметить, что несколько пар молекул продемонстрировали аддитивный эффект. Как показано на фиг. 34 и 35, соответственно, 39F11 и FGF21 демонстрировали аддитивный эффект при измерении в ходе репортерного анализа в примере 5, так же как 16H7 и 39H11.

Резюмируя данные, полученные в этой серии экспериментов, можно сказать, что наблюдалосьследующее: если антиген-связывающие белки были из одной и той же группы, *например,* 16H7 в паре с 20D4 (оба из группы A), то суммарная активность не была аддитивной. Этот феномен также наблюдали при образовании пары 12E4 с 26H11 (оба из группы B). Дополнительно, парные антиген-связывающие белки из неперекрывающихся групп демонстрировали аддитивную активность, *например,* 16H7 (группа A) в паре с 26H11 или 12E4 (группа B) или в паре с 39F7 (группа C). Кроме того, антиген-связывающие белки 26H11 и 12E4 (группа B)

демонстрировали аддитивный эффект в сочетании с антителами из группы A, но не из группы C, и это предполагает, что может иметь место некоторое перекрывание между сайтами связывания в группе B и группе C и/или что активированные конформации, индуцируемые антиген-связывающими белками из группы B и группы C, взаимно несовместимы. Наконец, как и ожидалось, при образовании пары функционально активного антиген-связывающего белка с нефункциональным антиген-связывающим белком *(например,* 2G10), который связывается с другим и неперекрывающимся сайтом связывания, отличным от такового для групп A, B или C, отсутствует влияние на активность функционально активного антиген-связывающего белка из группы A, B или C.

Все вместе эти данные предполагают, что раскрытые антиген-связывающие белки можно вводить совместно для усиления воздействия, которое данный антиген-связывающий белок может обеспечить сам по себе.

Каждый литературный источник, процитированный здесь, полностью включен сюда в качестве ссылки для всего, для чего он предназначен, и для всех целей.

Настоящее изобретение не может быть лимитировано по объему описанными здесь конкретными примерами воплощения, которые приведены в качестве иллюстраций отдельных особенностей изобретения, а функционально эквивалентные способы и компоненты образуют аспекты изобретения. Действительно, различные модификации изобретения, в дополнение к тем, что показаны и описаны здесь, будут очевидны для специалиста в данной области техники из вышеизложенного описания и сопутствующих графических материалов. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированное антитело или его фрагмент, которое способно связываться с β-Клото или комплексом, содержащим β-Клото и FGFR1c, и содержит следующие CDR:

(a) CDRH1: SEQ ID NO: 122, CDRH2: SEQ ID NO: 133, CDRH3: SEQ ID NO: 147, CDRL1: SEQ ID NO: 167, CDRL2: SEQ ID NO: 176 и CDRL3: SEQ ID NO: 189;

(b) CDRH1: SEQ ID NO: 122, CDRH2: SEQ ID NO: 134, CDRH3: SEQ ID NO: 148, CDRL1: SEQ ID NO: 166, CDRL2: SEQ ID NO: 176 и CDRL3: SEQ ID NO: 188;

(c) CDRH1: SEQ ID NO: 124, CDRH2: SEQ ID NO: 136, CDRH3: SEQ ID NO: 150, CDRL1: SEQ ID NO: 161, CDRL2: SEQ ID NO: 174 и CDRL3: SEQ ID NO: 183;

(d) CDRH1: SEQ ID NO: 124, CDRH2: SEQ ID NO: 138, CDRH3: SEQ ID NO: 152, CDRL1: SEQ ID NO: 162, CDRL2: SEQ ID NO: 173 и CDRL3: SEQ ID NO: 184;

(e) CDRH1: SEQ ID NO: 124, CDRH2: SEQ ID NO: 139, CDRH3: SEQ ID NO: 152, CDRL1: SEQ ID NO: 162, CDRL2: SEQ ID NO: 173 и CDRL3: SEQ ID NO: 186;

(f) CDRH1: SEQ ID NO: 124, CDRH2: SEQ ID NO: 137, CDRH3: SEQ ID NO: 151, CDRL1: SEQ ID NO: 164, CDRL2: SEQ ID NO: 173 и CDRL3: SEQ ID NO: 186;

(g) CDRH1: SEQ ID NO: 131, CDRH2: SEQ ID NO: 140, CDRH3: SEQ ID NO: 153, CDRL1: SEQ ID NO: 163, CDRL2: SEQ ID NO: 173 и CDRL3: SEQ ID NO: 185;

(h) CDRH1: SEQ ID NO: 123, CDRH2: SEQ ID NO: 135, CDRH3: SEQ ID NO: 149, CDRL1: SEQ ID NO: 159, CDRL2: SEQ ID NO: 172 и CDRL3: SEQ ID NO: 181;

(i) CDRH1: SEQ ID NO: 121, CDRH2: SEQ ID NO: 132, CDRH3: SEQ ID NO: 145, CDRL1: SEQ ID NO: 158, CDRL2: SEQ ID NO: 171 и CDRL3: SEQ ID NO: 180;

(j) CDRH1: SEQ ID NO: 126, CDRH2: SEQ ID NO: 133, CDRH3: SEQ ID NO: 154, CDRL1: SEQ ID NO: 168, CDRL2: SEQ ID NO: 171 и CDRL3: SEQ ID NO: 191;

(k) CDRH1: SEQ ID NO: 130, CDRH2: SEQ ID NO: 144, CDRH3: SEQ ID NO: 157, CDRL1: SEQ ID NO: 169, CDRL2: SEQ ID NO: 177 и CDRL3: SEQ ID NO: 192;

(l) CDRH1: SEQ ID NO: 129, CDRH2: SEQ ID NO: 142, CDRH3: SEQ ID NO: 156, CDRL1: SEQ ID NO: 163, CDRL2: SEQ ID NO: 173 и CDRL3: SEQ ID NO: 194;

(m) CDRH1: SEQ ID NO: 128, CDRH2: SEQ ID NO: 141, CDRH3: SEQ ID NO: 156, CDRL1: SEQ ID NO: 163, CDRL2: SEQ ID NO: 173 и CDRL3: SEQ ID NO: 194;

(n) CDRH1: SEQ ID NO: 127, CDRH2: SEQ ID NO: 135, CDRH3: SEQ ID NO: 155, CDRL1: SEQ ID NO: 170, CDRL2: SEQ ID NO: 178 и CDRL3: SEQ ID NO: 193; или

(o) CDRH1: SEQ ID NO: 128, CDRH2: SEQ ID NO: 143, CDRH3: SEQ ID NO: 156, CDRL1: SEQ ID NO: 163, CDRL2: SEQ ID NO: 179 и CDRL3: SEQ ID NO: 194.

2. Изолированное антитело или его фрагмент, которое способно связываться с β-Клото или комплексом, содержащим β-Клото и FGFR1c, при этом указанное изолированное антитело или его фрагмент содержит:

(a) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 49, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 67;

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 50, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 69;

(c) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 51, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 70;

(d) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 52, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 71;

(e) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 53, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 72;

(f) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 54, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 73;

(g) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 56, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 74;

(h) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 57, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 76;

(i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 59, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 78;

(j) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 60, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 79;

(k) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 61, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 80;

(l) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 62, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 81;

(m) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 63, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 82;

(n) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 64, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 83; и

(o) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 65, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 84.

3. Изолированное антитело или его фрагмент по п. 2, отличающееся тем, что указанное изолированное антитело или его фрагмент содержит:

(a) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 49, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 67;

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 50, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 69;

(c) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 51, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 70;

(d) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 52, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 71;

(e) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 53, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 72;

(f) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 54, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 73;

(g) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 56, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 74;

(h) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 57, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 76;

(i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 59, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 78;

(j) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 60, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 79;

(k) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 61, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 80;

(l) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 62, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 81;

(m) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 63, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 82;

(n) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 64, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 83; или

(o) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 65, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 84.

4. Изолированное антитело или его фрагмент по п. 3, отличающееся тем, что указанное изолированное антитело или его фрагмент содержит:

(a) SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 67,
(b) SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 69,
(c) SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 70,
(d) SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 71,
(e) SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 72,
(f) SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 73,
(g) SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 74,
(h) SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 76,
(i) SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 78,
(j) SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 79,
(k) SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 80,
(l) SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 81,
(m)SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 82,
(n) SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 83 или
(o) SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 84.

5. Изолированное антитело или его фрагмент, которое способно связываться с β-Клото или комплексом, содержащим β-Клото и FGFR1c, при этом указанное изолированное антитело или его фрагмент содержит:

(a) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 13, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 31,

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 33;

(c) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 34;

(d) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 35;

(e) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 17, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 36;

(f) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 18, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 37,

(g) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 38;

(h) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 21, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 40;

(i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 41;

(j) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 24, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 42;

(k) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 46;

(l) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 47;

(m) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 27, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 44;

(n) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 43; и

(o) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 29, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 45.

6. Изолированное антитело или его фрагмент по п. 5, отличающееся тем, что указанное изолированное антитело или его фрагмент содержит:

(a) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 13, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 31,

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33;

(c) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 34;

(d) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35;

(e) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 17, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 36;

(f) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 18, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 37,

(g) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 38;

(h) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 21, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 40;

(i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 41;

(j) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 24, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 42;

(k) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 25, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 46;

(l) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 26, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 47;

(m) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 27, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 44;

(n) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 43; и

(o) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 29, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 45.

7. Изолированное антитело или его фрагмент по п. 6, отличающееся тем, что указанное изолированное антитело или его фрагмент содержит:

(a) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 13, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 31,

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 33;

(c) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 34;

(d) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 35;

(e) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 17, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 36;

(f) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 18, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 37;

(g) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 38;

(h) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 21, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 40;

(i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 41;

(j) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 24, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 42;

(k) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 25, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 46;

(l) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 26, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 47;

(m) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 27, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 44;

(n) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 43; и

(o) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 29, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 45.

8. Изолированное антитело или его фрагмент по п. 1 или 7, отличающееся тем, что указанное антитело или его фрагмент содержит:

(a) SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 31,

(b) SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 33,
(c) SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 34,
(d) SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 35,
(e) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 36,
(f) SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 37,
(g) SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 38,
(h) SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 40,
(i) SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 41,
(j) SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 42,
(k) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 46,
(l) SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 47,
(m)SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 44,
(n) SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 43 или
(o) SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 45.

9. Фармацевтическая композиция для лечения диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии, НАСГ, сердечно-сосудистого заболевания или метаболического синдрома, содержащая изолированное антитело или его фрагмент по любому предшествующему пункту в смеси с его фармацевтически приемлемым носителем.

10. Изолированная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи антигенсвязывающего белка, который способен связываться с β-Клото или комплексом, содержащим β-Клото и FGFR1c, при этом

a) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 85, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO. : 103,

b) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 86, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 104;

c) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 87, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 105;

d) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 87, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 106;

e) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 88, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 107;

f) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 89, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 108;

g) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 90, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 109;

h) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 91, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 110;

i) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 93, и последовательность, кодирующая

вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 112;

k) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 95, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 113;

m) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 96, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 114;

n) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 97, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 115;

o) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 98, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 116;

p) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 117;

q) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 100, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 118;

r) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 101, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 119; или

s) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 102, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO.: 120.

11. Изолированная нуклеиновая кислота по п. 10, где:

a) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 85, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 103;

b) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 86, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 104;

c) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 87, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 105;

d) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 87, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 106;

e) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 88, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 107;

f) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 89, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 108;

g) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 90, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 109;

h) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 91, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 110;

i) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 93, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 111;

j) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 93, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 112;

k) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 94, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 113;

l) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 95, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 113;

m) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 96, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 114;

n) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 97, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 115;

o) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 98, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 116;

p) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 99, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 117;

q) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 100, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 118;

r) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 101, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 119; или

s) последовательность, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, содержит SEQ ID NO: 102, и последовательность, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO: 120/

12. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 10 или 11.

13. Изолированная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 10 или 11.

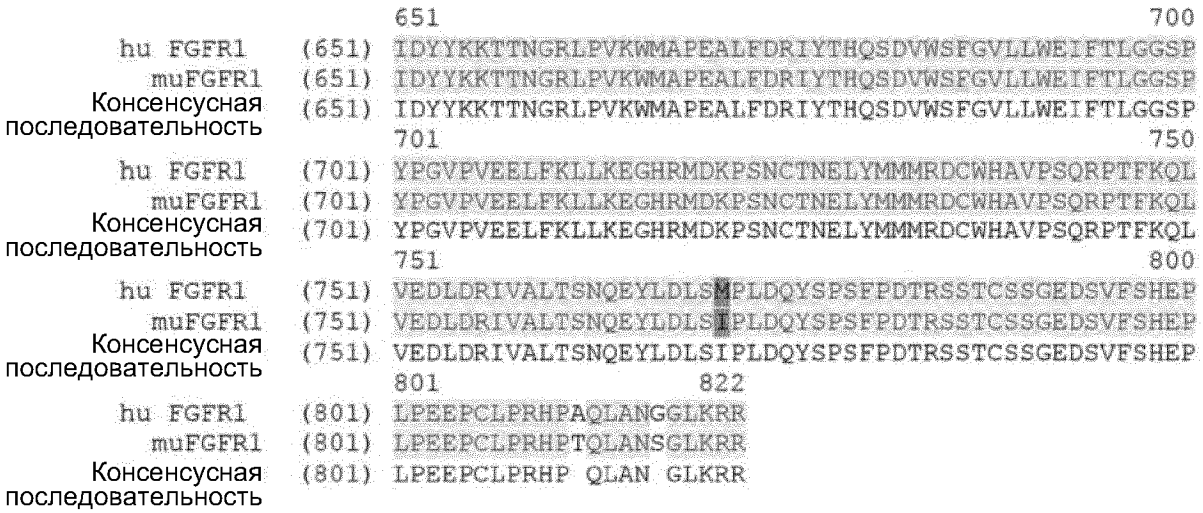
14. Изолированная клетка, содержащая экспрессионный вектор по п. 13, или антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8.

15. Способ получения антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с β-Клото или комплексом, содержащим β- Клото и FGFR1c, включающий инкубацию клетки по п. 14 в условиях, которые позволяют ей экспрессировать антитело или его фрагмент.

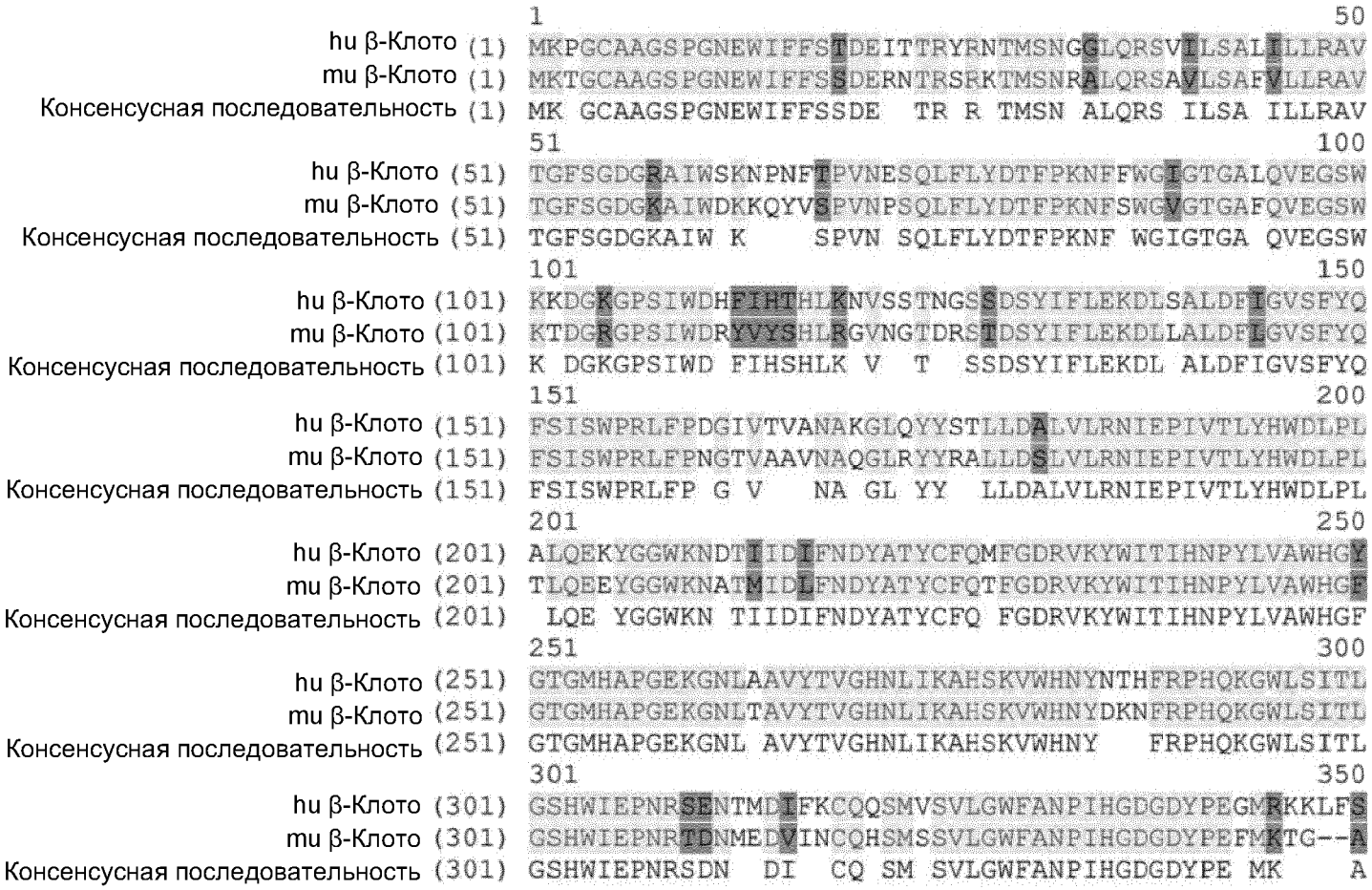
1A

```
                        1                                                  50
hu FGFR1          (1)   MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDL
muFGFR1           (1)   MWGWKCLLFWAVLVTATLCTARPAPTLPEQAQPWGVPVEVESLLVHPGDL
Консенсусная      (1)   MW WKCLLFWAVLVTATLCTARPAPTLPEQAQPWG PVEVES LVHPGDL
последовательность
                       51                                                 100
hu FGFR1         (51)   LQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYA
muFGFR1          (51)   LQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLVESNRTRITGEEVEVRDSIPADSGLYA
Консенсусная     (51)   LQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQL ESNRTRITGEEVEV DSIPADSGLYA
последовательность
                      101                                                 150
hu FGFR1        (101)   CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMP
muFGFR1         (101)   CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRRP
Консенсусная    (101)   CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNR P
последовательность
                      151                                                 200
hu FGFR1        (151)   VAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPD
muFGFR1         (151)   VAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPD
Консенсусная    (151)   VAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPD
последовательность
                      201                                                 250
hu FGFR1        (201)   HRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVER
muFGFR1         (201)   HRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVER
Консенсусная    (201)   HRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVER
последовательность
                      251                                                 300
hu FGFR1        (251)   SPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKI
muFGFR1         (251)   SPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKI
Консенсусная    (251)   SPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKI
последовательность
                      301                                                 350
hu FGFR1        (301)   GPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLS
muFGFR1         (301)   GPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLS
Консенсусная    (301)   GPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLS
последовательность
                      351                                                 400
hu FGFR1        (351)   HHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMK
muFGFR1         (351)   HHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMLGSVIIYKMK
Консенсусная    (351)   HHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMLGSVIIYKMK
последовательность
                      401                                                 450
hu FGFR1        (401)   SGTKKSDFHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLS
muFGFR1         (401)   SGTKKSDFHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLS
Консенсусная    (401)   SGTKKSDFHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLS
последовательность
                      451                                                 500
hu FGFR1        (451)   SSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGL
muFGFR1         (451)   SSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGL
Консенсусная    (451)   SSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGL
последовательность
                      501                                                 550
hu FGFR1        (501)   DKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLGA
muFGFR1         (501)   DKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLGA
Консенсусная    (501)   DKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLGA
последовательность
                      551                                                 600
hu FGFR1        (551)   CTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLSSKDL
muFGFR1         (551)   CTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLSSKDL
Консенсусная    (551)   CTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLSSKDL
последовательность
                      601                                                 650
hu FGFR1        (601)   VSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHH
muFGFR1         (601)   VSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHH
Консенсусная    (601)   VSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHH
последовательность
```

Фиг. 1B


651 700
hu FGFR1 (651) IDYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSP
muFGFR1 (651) IDYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSP
Консенсусная последовательность (651) IDYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSP
701 750
hu FGFR1 (701) YPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQL
muFGFR1 (701) YPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQL
Консенсусная последовательность (701) YPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQL
751 800
hu FGFR1 (751) VEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPDTRSSTCSSGEDSVFSHEP
muFGFR1 (751) VEDLDRIVALTSNQEYLDLSIPLDQYSPSFPDTRSSTCSSGEDSVFSHEP
Консенсусная последовательность (751) VEDLDRIVALTSNQEYLDLSIPLDQYSPSFPDTRSSTCSSGEDSVFSHEP
801 822
hu FGFR1 (801) LPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR
muFGFR1 (801) LPEEPCLPRHPTQLANSGLKRR
Консенсусная последовательность (801) LPEEPCLPRHP QLAN GLKRR

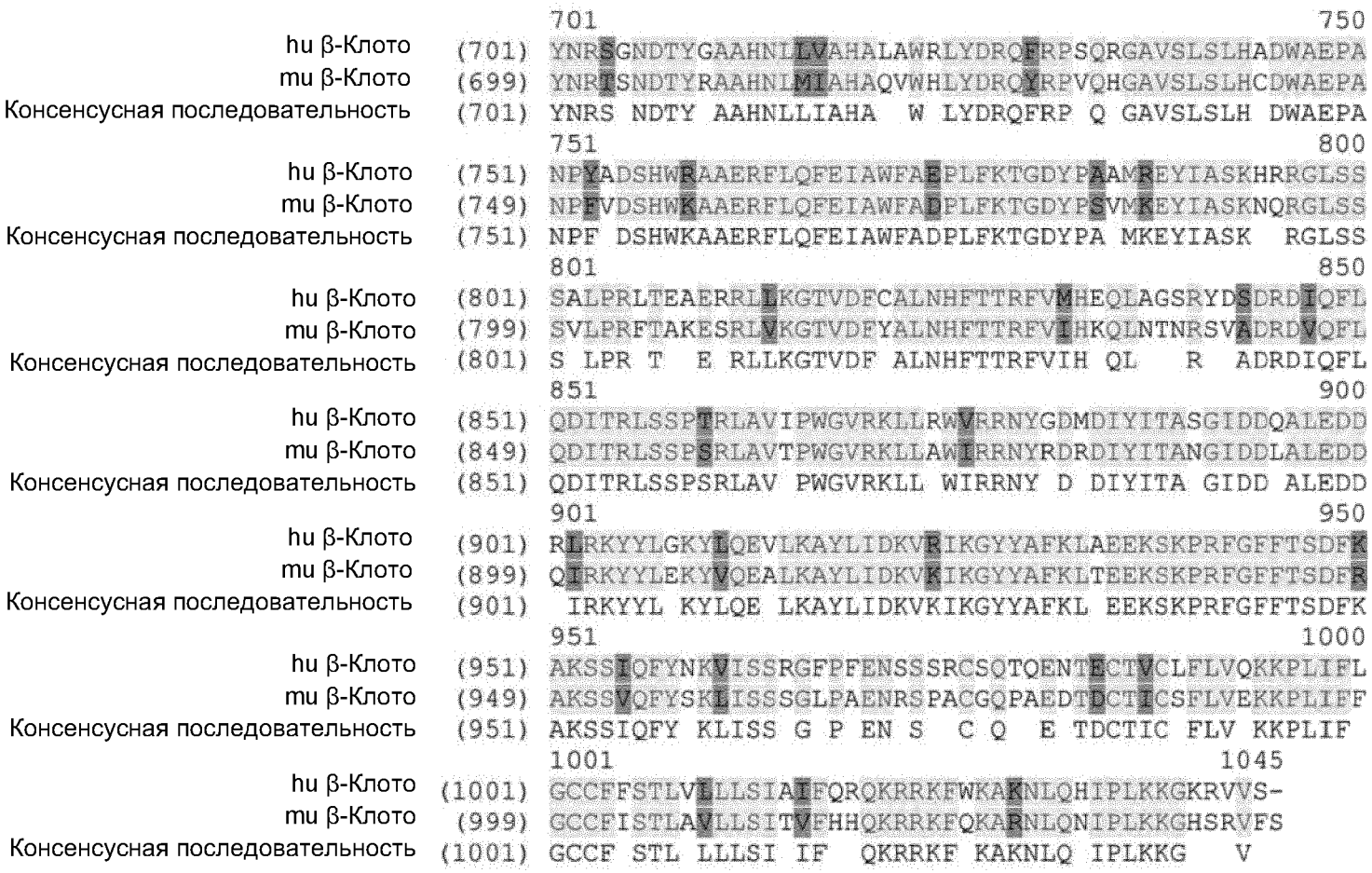
Фиг. 2A


1 50
hu β-Клото (1) MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAV
mu β-Клото (1) MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRAV
Консенсусная последовательность (1) MK GCAAGSPGNEWIFFSSDE TR R TMSN ALQRS ILSA ILLRAV
51 100
hu β-Клото (51) TGFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
mu β-Клото (51) TGFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSW
Консенсусная последовательность (51) TGFSGDGKAIW K SPVN SQLFLYDTFPKNF WGIGTGA QVEGSW
101 150
hu β-Клото (101) KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
mu β-Клото (101) KTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQ
Консенсусная последовательность (101) K DGKGPSIWD FIHSHLK V T SSDSYIFLEKDL ALDFIGVSFYQ
151 200
hu β-Клото (151) FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
mu β-Клото (151) FSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPL
Консенсусная последовательность (151) FSISWPRLFP G V NA GL YY LLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
201 250
hu β-Клото (201) ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGY
mu β-Клото (201) TLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGF
Консенсусная последовательность (201) LQE YGGWKN TIIDIFNDYATYCFQ FGDRVKYWITIHNPYLVAWHGF
251 300
hu β-Клото (251) GTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITL
mu β-Клото (251) GTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITL
Консенсусная последовательность (251) GTGMHAPGEKGNL AVYTVGHNLIKAHSKVWHNY FRPHQKGWLSITL
301 350
hu β-Клото (301) GSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
mu β-Клото (301) GSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTG--A
Консенсусная последовательность (301) GSHWIEPNRSDN DI CQ SM SVLGWFANPIHGDGDYPE MK A

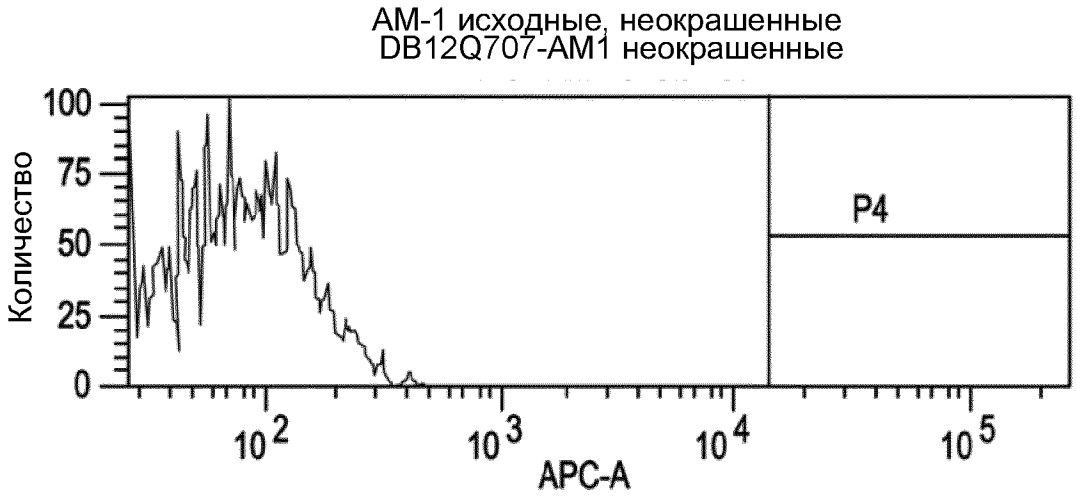
Фиг. 2B

```
                                351                                                  400
hu β-Клото                (351) VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL
mu β-Клото                (349) MIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVL
Консенсусная последовательность (351) MIP FSEAEK EMRGTADFFAFSFGPNNFKP NTM KMGQNVSLNLR  L
                                401                                                  450
hu β-Клото                (401) NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
mu β-Клото                (399) NWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFD
Консенсусная последовательность (401) NWIKLEY  P ILIAENGWFTDS IKTEDTTAIYMMKNFL QVLQAIK D
                                451                                                  500
hu β-Клото                (451) EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYK
mu β-Клото                (449) EIRVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYK
Консенсусная последовательность (451) EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYT RRGLFYVDFNS QKERKPKSSAHYYK
                                501                                                  550
hu β-Клото                (501) QIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL
mu β-Клото                (499) QIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHL
Консенсусная последовательность (501) QII DNGF LKESTPDM G FPCDFSWGVTESVLKPE   SSPQFSDPHL
                                551                                                  600
hu β-Клото                (551) YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFA
mu β-Клото                (549) YVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFA
Консенсусная последовательность (551) YVWN TGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFV IKK LEMLAKMKVTHY FA
                                601                                                  650
hu β-Клото                (601) LDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLG
mu β-Клото                (599) LDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGLKLGVFPMVTLYHPTHSHLG
Консенсусная последовательность (601) LDW SILPTGNLS VNRQ LRYYRCVVSEGLKLGI  MVTLYHPTHAHLG
                                651                                                  700
hu β-Клото                (651) LPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDI
mu β-Клото                (649) LPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDM
Консенсусная последовательность (651) LP PLL A GWLN  TA AFQ YA LCF ELGDLVKLWITINEPNRLSDI
```

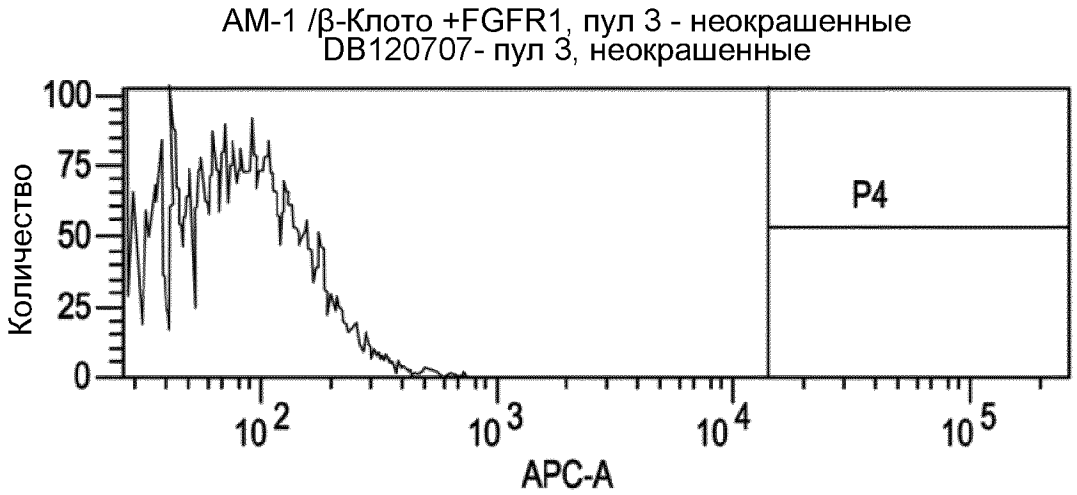
Фиг. 2C


701 750
hu β-Клото (701) YNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPA
mu β-Клото (699) YNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLSLHCDWAEPA
Консенсусная последовательность (701) YNRS NDTY AAHNLLIAHA W LYDRQFRP Q GAVSLSLH DWAEPA
751 800
hu β-Клото (751) NPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
mu β-Клото (749) NPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRGLSS
Консенсусная последовательность (751) NPF DSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPA MKEYIASK RGLSS
801 850
hu β-Клото (801) SALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFL
mu β-Клото (799) SVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFL
Консенсусная последовательность (801) S LPR T E RLLKGTVDF ALNHFTTRFVIH QL R ADRDIQFL
851 900
hu β-Клото (851) QDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDD
mu β-Клото (849) QDITRLSSPSRLAVTPWGVRKLLAWIRRNYRDRDIYITANGIDDLALEDD
Консенсусная последовательность (851) QDITRLSSPSRLAV PWGVRKLL WIRRNY D DIYITA GIDD ALEDD
901 950
hu β-Клото (901) RLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFK
mu β-Клото (899) QTRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFR
Консенсусная последовательность (901) IRKYYL KYLQE LKAYLIDKVKIKGYYAFKL EEKSKPRFGFFTSDFK
951 1000
hu β-Клото (951) AKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFL
mu β-Клото (949) AKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLVEKKPLIFF
Консенсусная последовательность (951) AKSSIQFY KLISS G P EN S C Q E TDCTIC FLV KKPLIF
1001 1045
hu β-Клото (1001) GCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS-
mu β-Клото (999) GCCFISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS
Консенсусная последовательность (1001) GCCF STL LLLSI IF QKRRKF KAKNLQ IPLKKG V

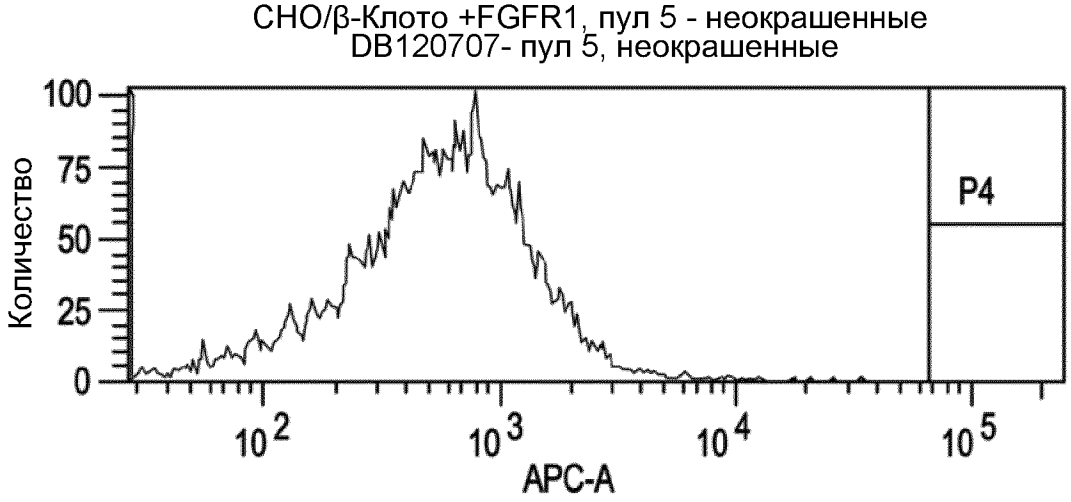
Фиг. 3A



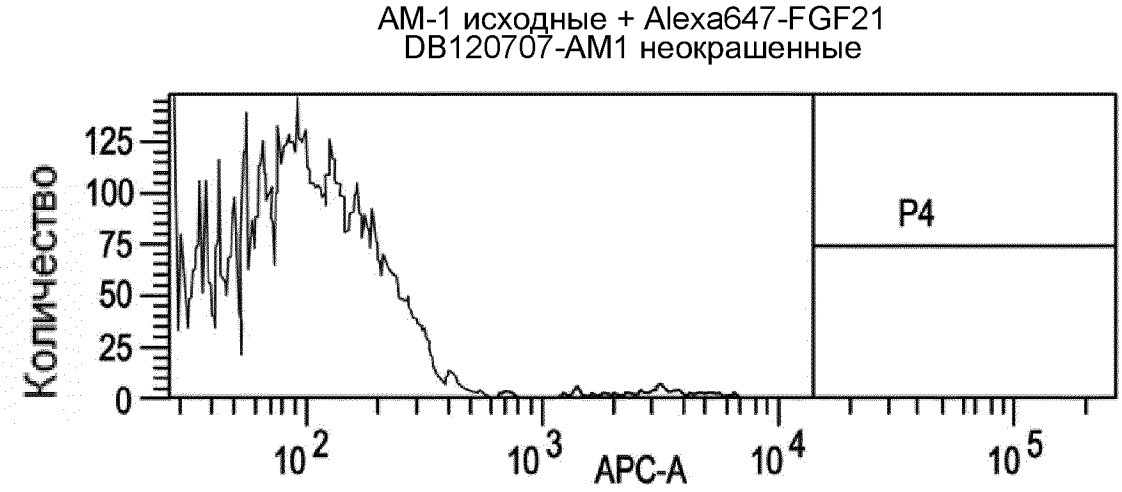
Фиг. 3B



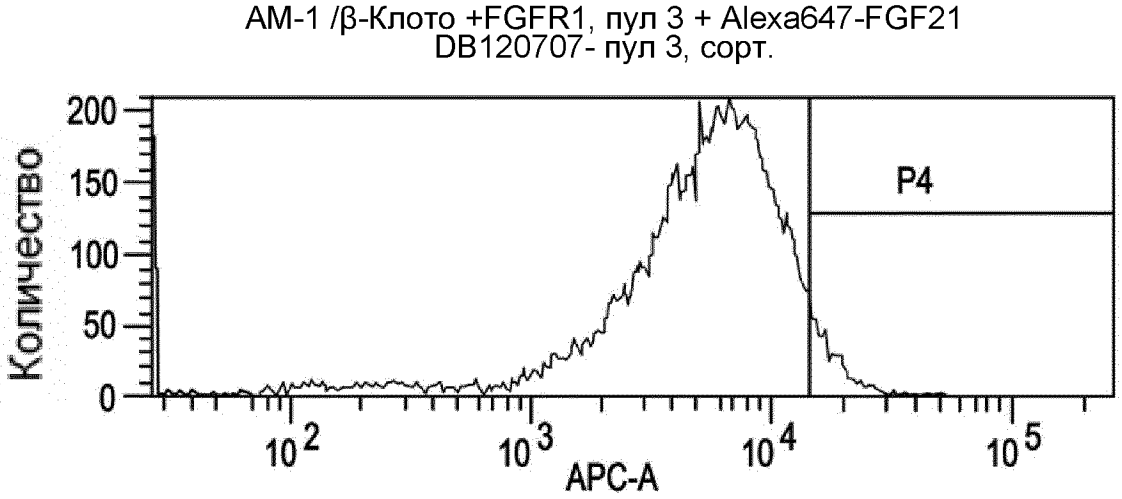
Фиг. 3C



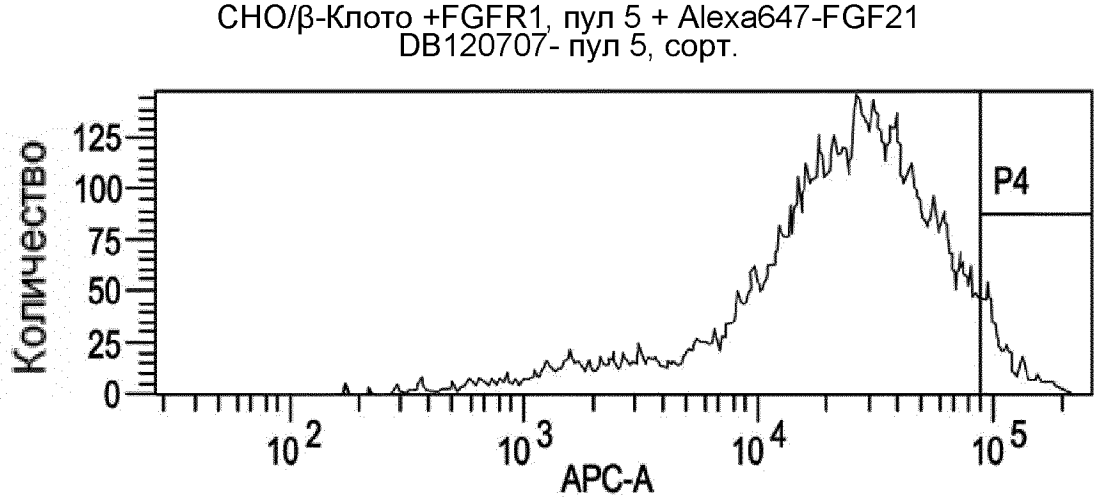
Фиг. 3D



Фиг. 3E



Фиг. 3F :



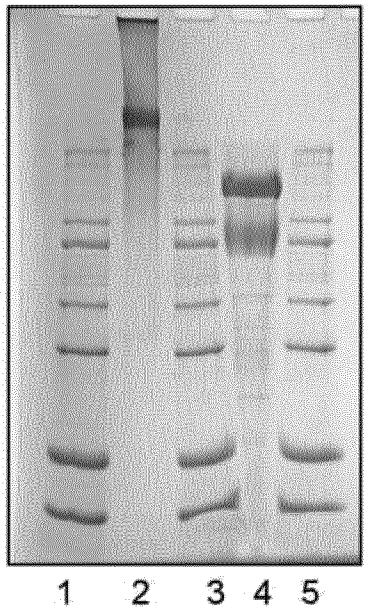
Фиг.4

DPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQL
AESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSS
EDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFK
CPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNYT
CIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYS
DPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSF
EDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLY*ggggg*dkthtc
ppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcVvvdvshedpevkfnwy
vdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeyKckvsnkalpa
piektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewE
sngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhn
hytqkslslspgk

Фиг. 5

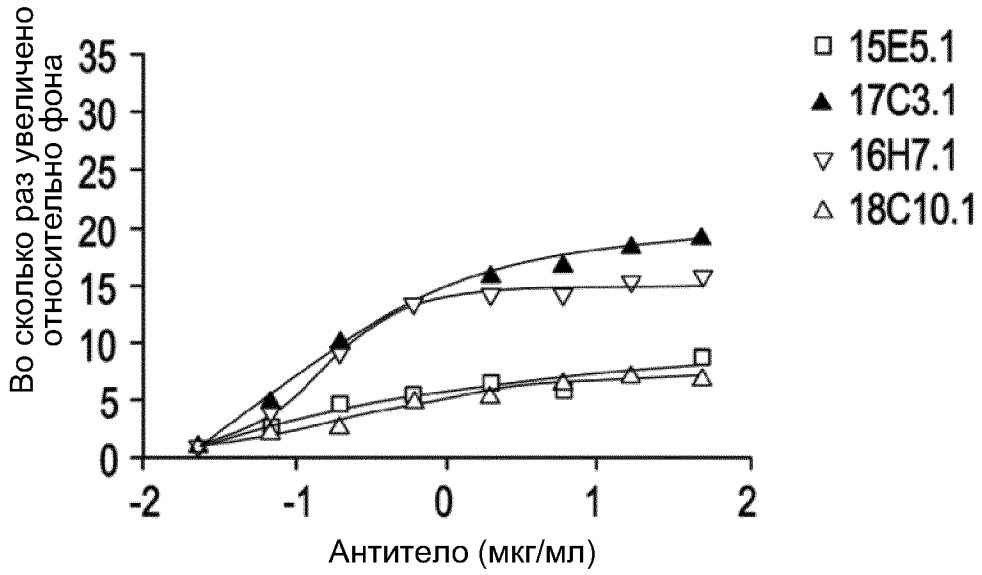
FSGDGRAI WSKNPNFTPV NESQLFLYDT FPKNFFWGIG TGALQVEGSW
KKDGKGPSIW DHFIHTHLKN VSSTNGSSDS YIFLEKDLSA LDFIGVSFYQ
FSISWPRLFP DGIVTVANAK GLQYYSTLLD ALVLRNIEPI VTLYHWDLPL
ALQEKYGGWK NDTIIDIFND YATYCFQMFG DRVKYWITIH NPYLVAWHGY
GTGMHAPGEK GNLAAVYTVG HNLIKAHSKV WHNYNTHFRP HQKGWLSITL
GSHWIEPNRS ENTMDIFKCQ QSMVSVLGWF ANPIHGDGDY PEGMRKKLFS
VLPIFSEAEK HEMRGTADFF AFSFGPNNFK PLNTMAKMGQ NVSLNLREAL
NWIKLEYNNP RILIAENGWF TDSRVKTEDT TAIYMMKNFL SQVLQAIRLD
EIRVFGYTAW SLLDGFEWQD AYTIRRGLFY VDFNSKQKER KPKSSAHYYK
QIIRENGFSL KESTPDVQGQ FPCDFSWGVT ESVLKPESVA SSPQFSDPHL
YVWNATGNRL LHRVEGVRLK TRPAQCTDFV NIKKQLEMLA RMKVTHYRFA
LDWASVLPTG NLSAVNRQAL RYYRCVVSEG LKLGISAMVT LYYPTHAHLG
LPEPLLHADG WLNPSTAEAF QAYAGLCFQE LGDLVKLWIT INEPNRLSDI
YNRSGNDTYG AAHNLLVAHA LAWRLYDRQF RPSQRGAVSL SLHADWAEPA
NPYADSHWRA AERFLQFEIA WFAEPLFKTG DYPAAMREYI ASKHRRGLSS
SALPRLTEAE RRLLKGTVDF CALNHFTTRF VMHEQLAGSR YDSDRDIQFL
QDITRLSSPT RLAVIPWGVR KLLRWVRRNY GDMDIYITAS GIDDQALEDD
RLRKYYLGKY LQEVLKAYLI DKVRIKGYYA FKLAEEKSKP RFGFFTSDFK
AKSSIQFYNK VISSRGFPFE NSSSRCSQTQ ENTECTVCLF LVQKKP
*ggggg*dkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshe
dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstYrvvsvltvlhqdwlngkeykckv
snkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdi
avewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhea
lhnhytqkslslspgk

Фиг. 6

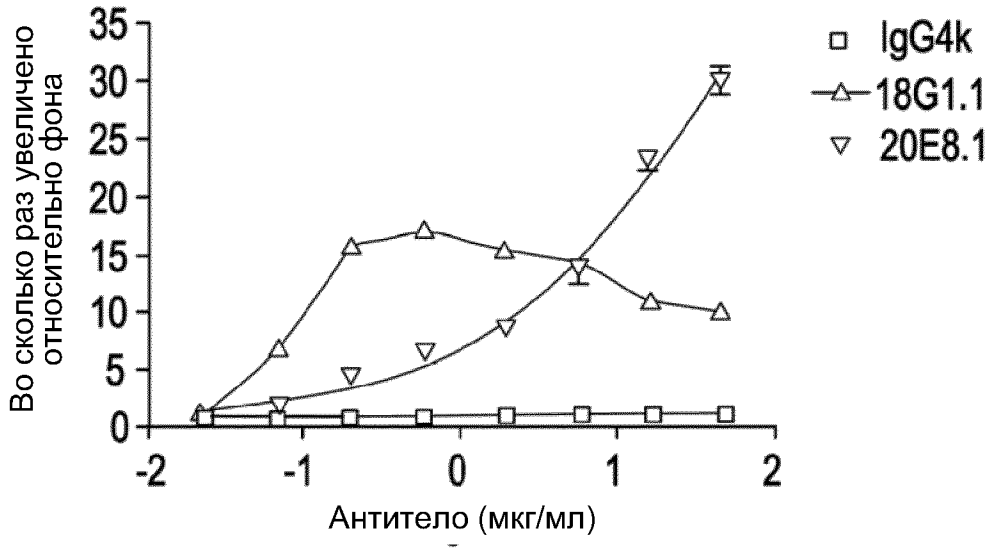


1. Маркеры молекулярной массы
2. Гетеродимер, невосстанавливающие условия
3. Станд.
4. Гетеродимер, восстанавливающие условия
5. Маркеры молекулярной массы

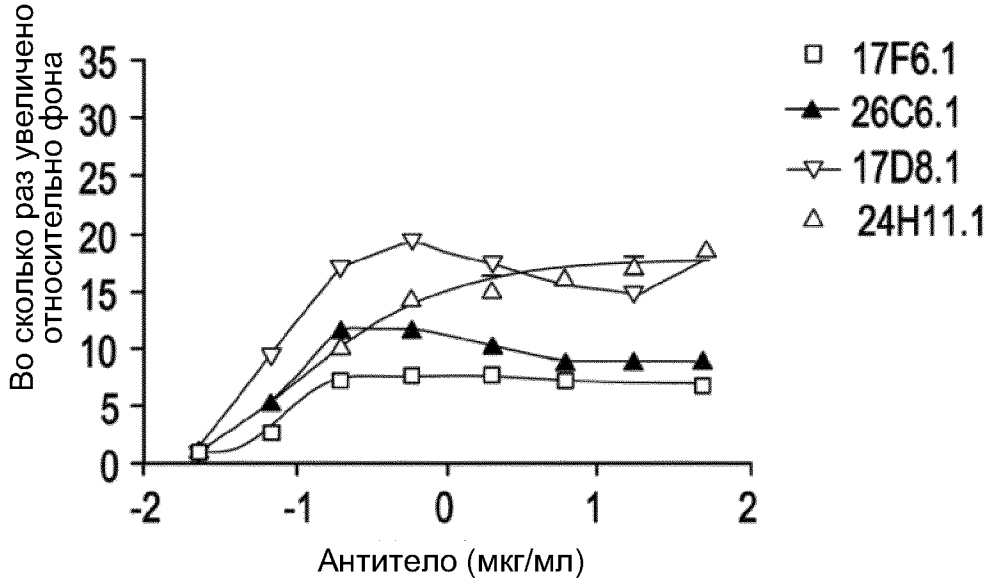
Фиг. 7A


Во сколько раз увеличено относительно фона
35
30
25
20
15
10
5
0
-2
-1
0
1
2
Антитело (мкг/мл)
15E5.1
17C3.1
16H7.1
18C10.1

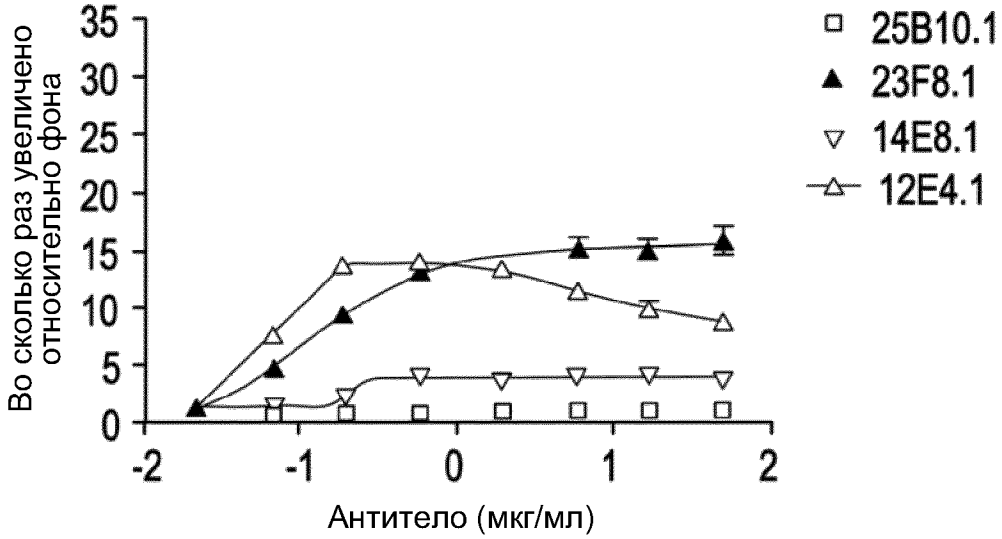
Фиг. 7B


Во сколько раз увеличено относительно фона
35
30
25
20
15
10
5
0
-2
-1
0
1
2
Антитело (мкг/мл)
IgG4k
18G1.1
20E8.1

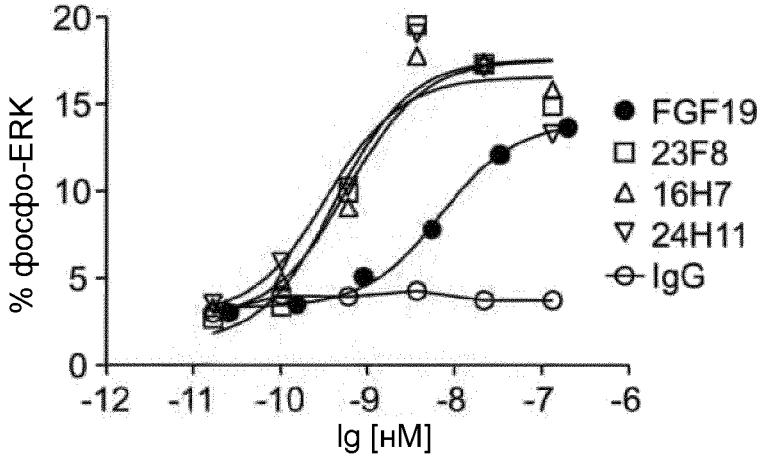
Фиг. 7C


Во сколько раз увеличено относительно фона
35
30
25
20
15
10
5
0
-2
-1
0
1
2
Антитело (мкг/мл)
17F6.1
26C6.1
17D8.1
24H11.1

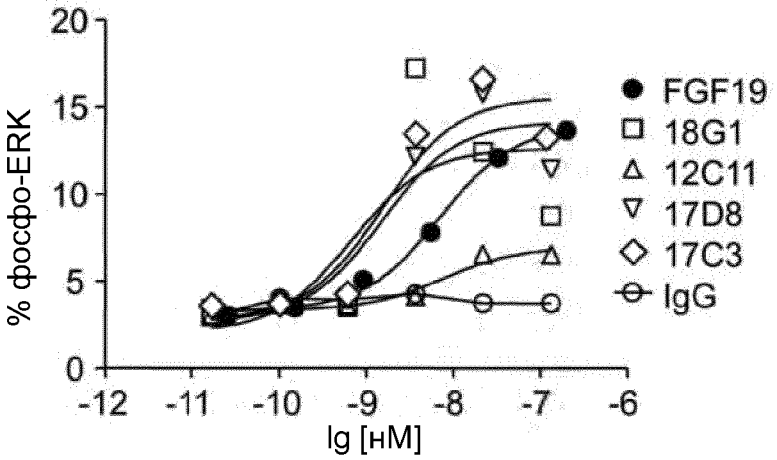
Фиг. 7D


Во сколько раз увеличено относительно фона
35
30
25
20
15
10
5
0
-2
-1
0
1
2
Антитело (мкг/мл)
25B10.1
23F8.1
14E8.1
12E4.1

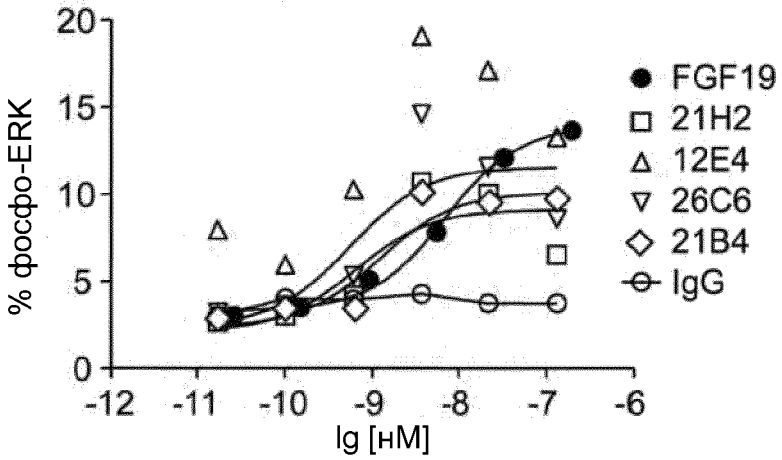
Фиг. 8A



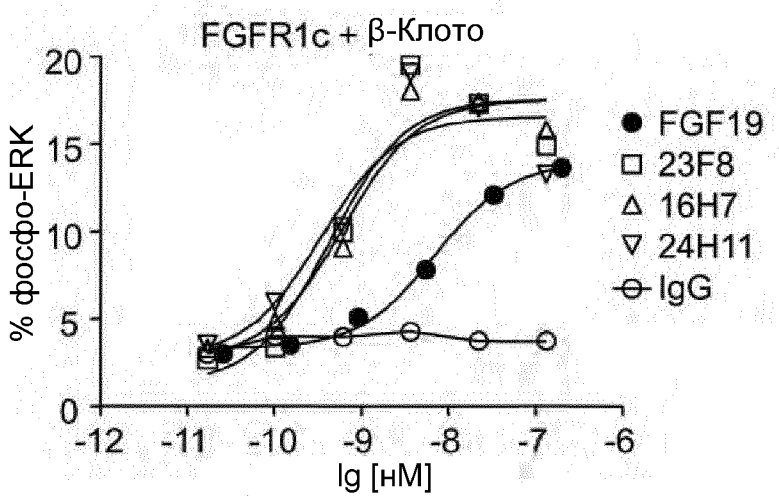
Фиг. 8B



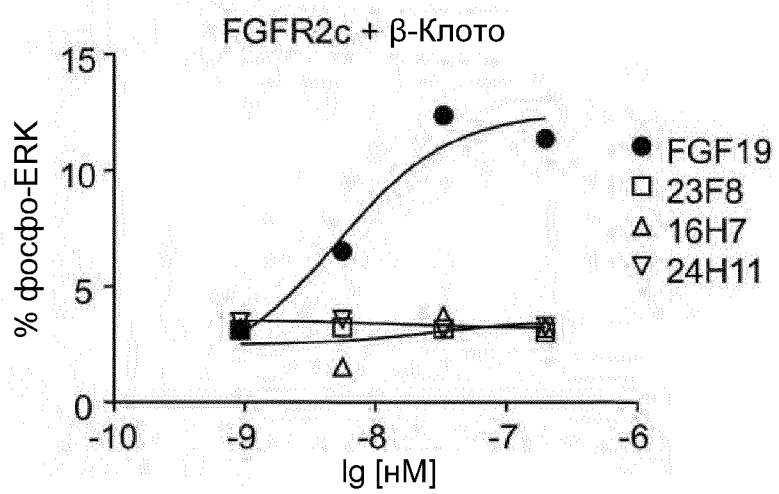
Фиг. 8C



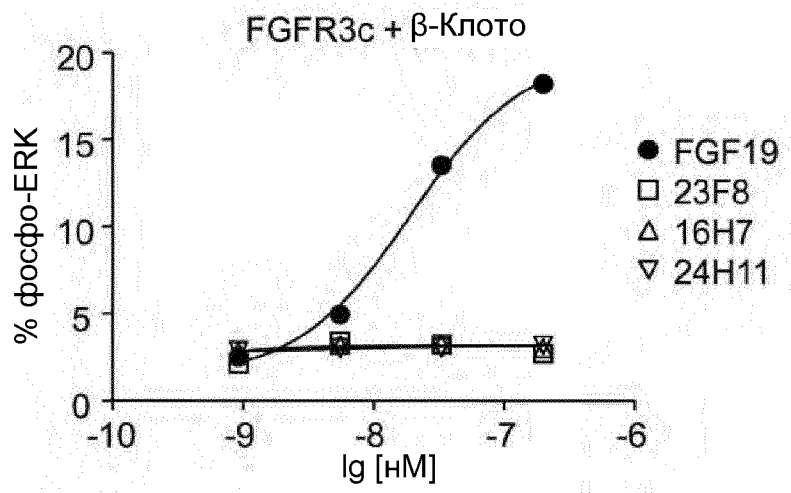
Фиг. 9A



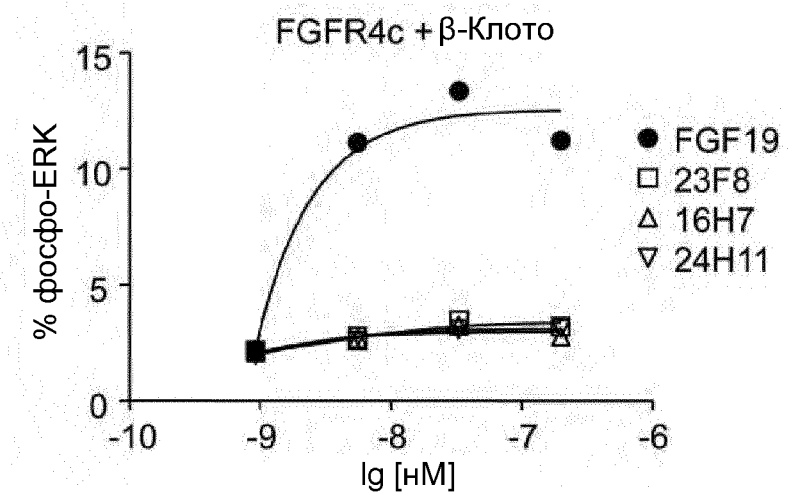
Фиг. 9B



Фиг. 9C

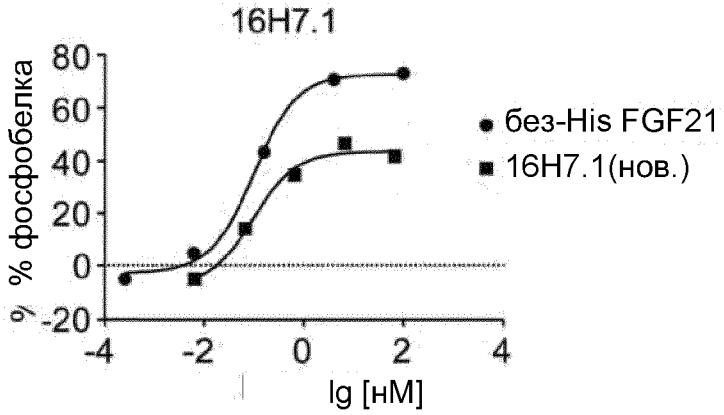


Фиг. 9D

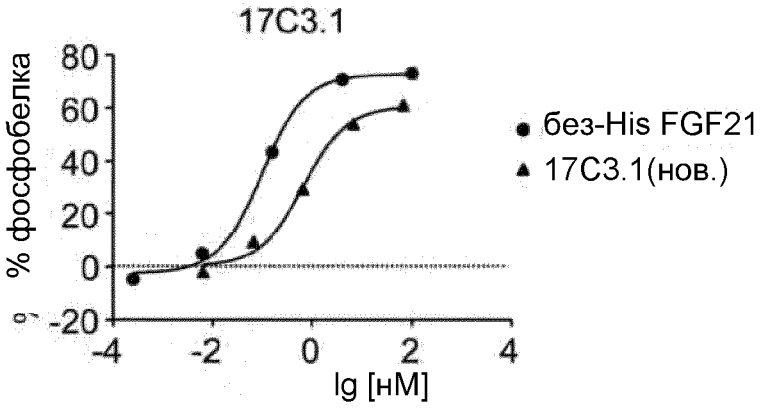


ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

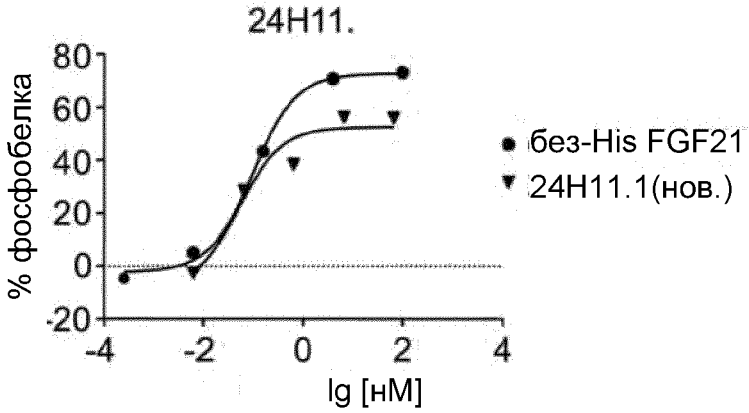
Фиг. 10A



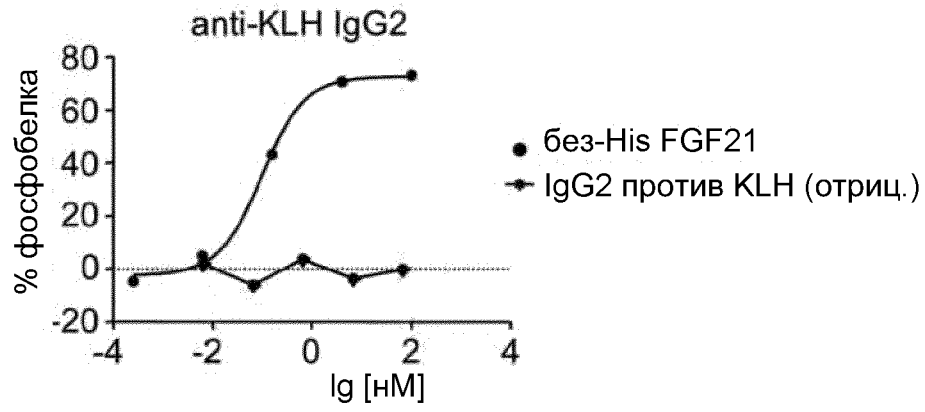
Фиг. 10B



Фиг. 10C

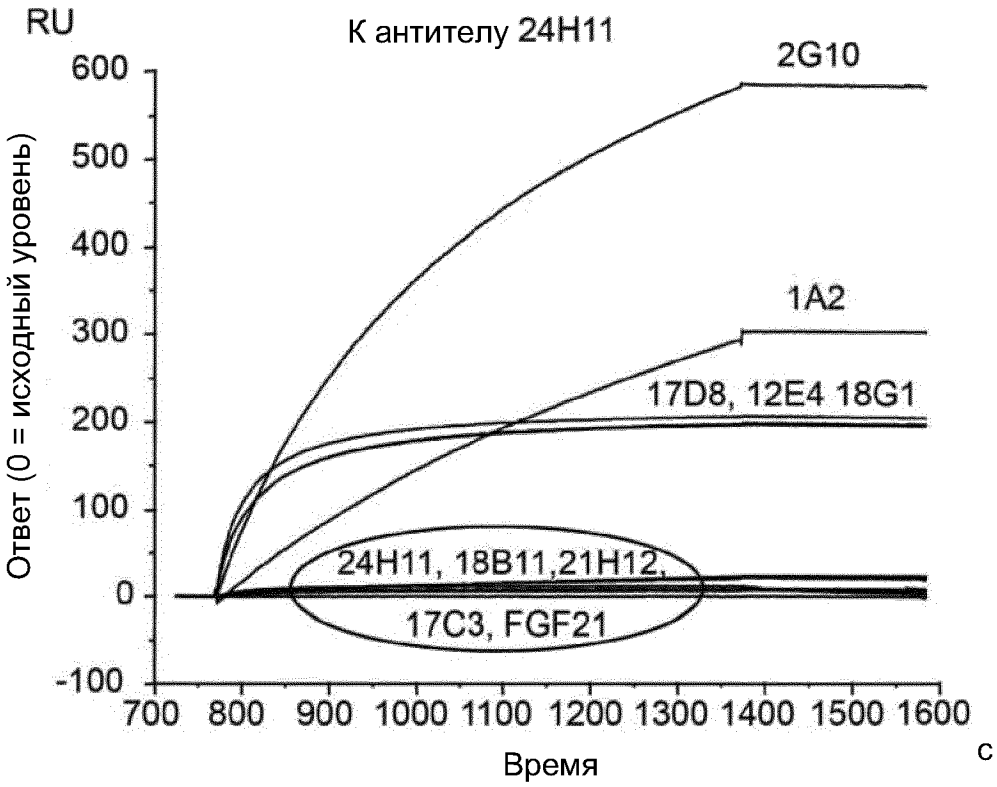


Фиг. 10D

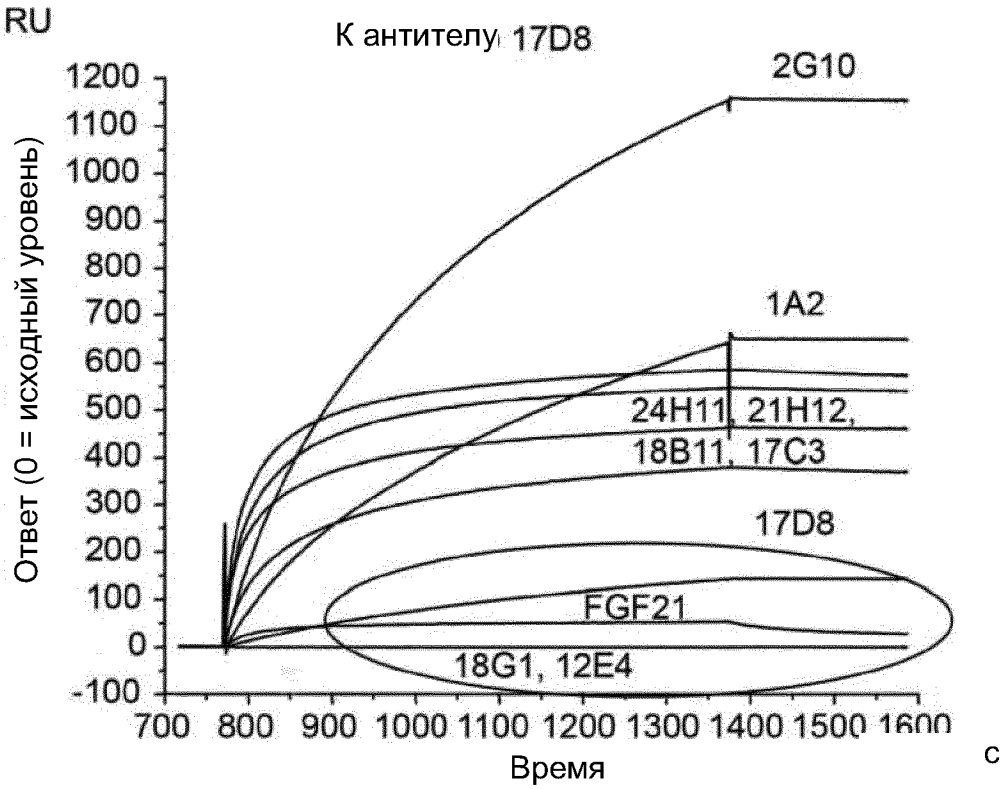


ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

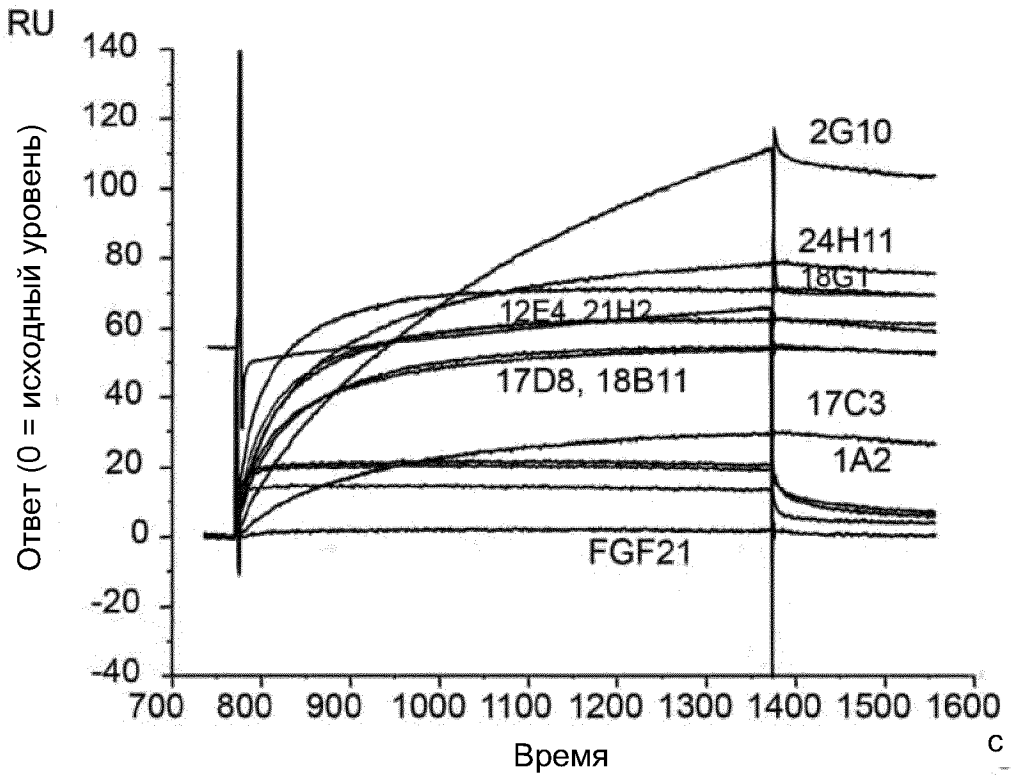
Фиг. 11A


RU
К антителу 24H11
2G10
1A2
17D8, 12E4 18G1
24H11, 18B11,21H12,
17C3, FGF21
Ответ (0 = исходный уровень)
600
500
400
300
200
100
0
-100
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
Время
с

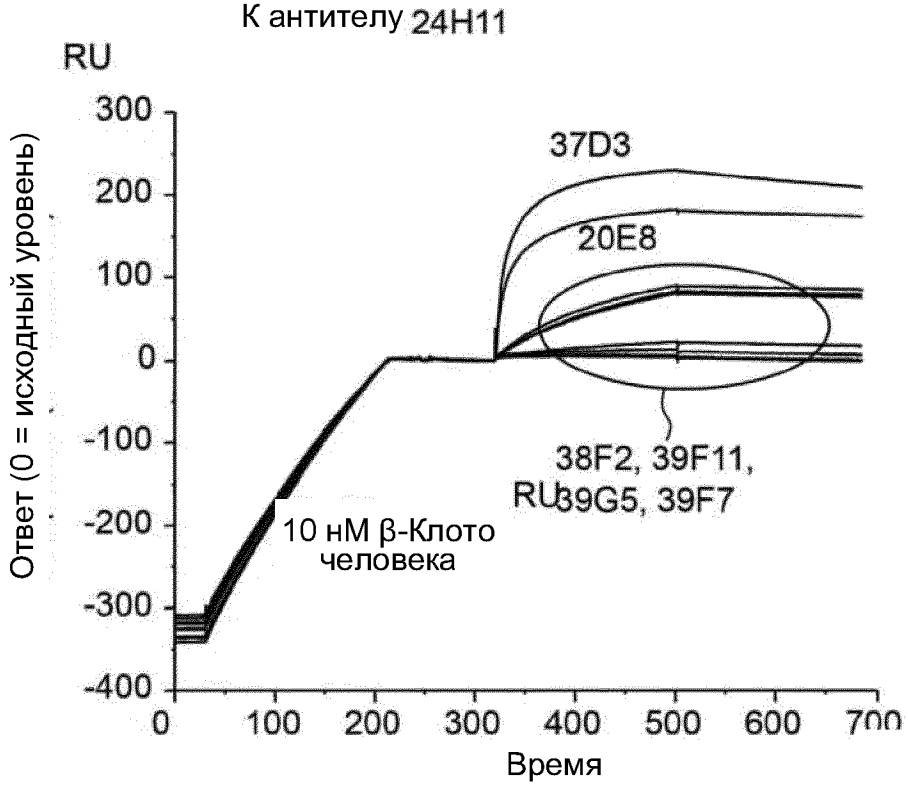
Фиг. 11B


RU
К антителу 17D8
Ответ (0 = исходный уровень)
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
2G10
1A2
24H11, 21H12,
18B11, 17C3
17D8
FGF21
18G1, 12E4
700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600
Время
с

Фиг. 11C

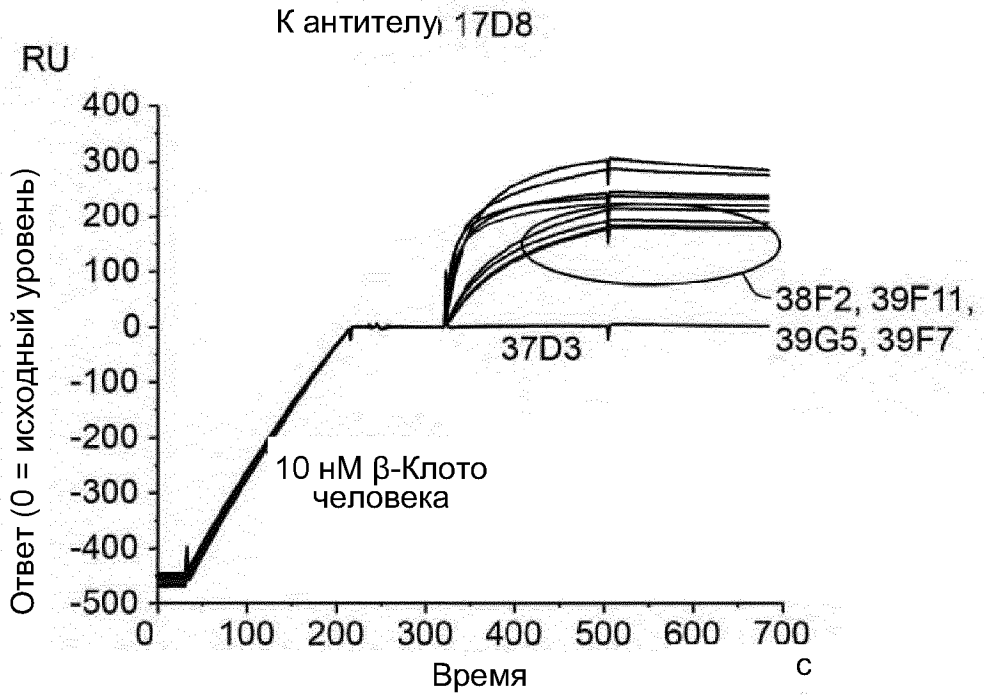

RU
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
Ответ (0 = исходный уровень)
2G10
24H11
18G1
12E4, 21H2
17D8, 18B11
17C3
1A2
FGF21
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
Время
с

Фиг. 11D

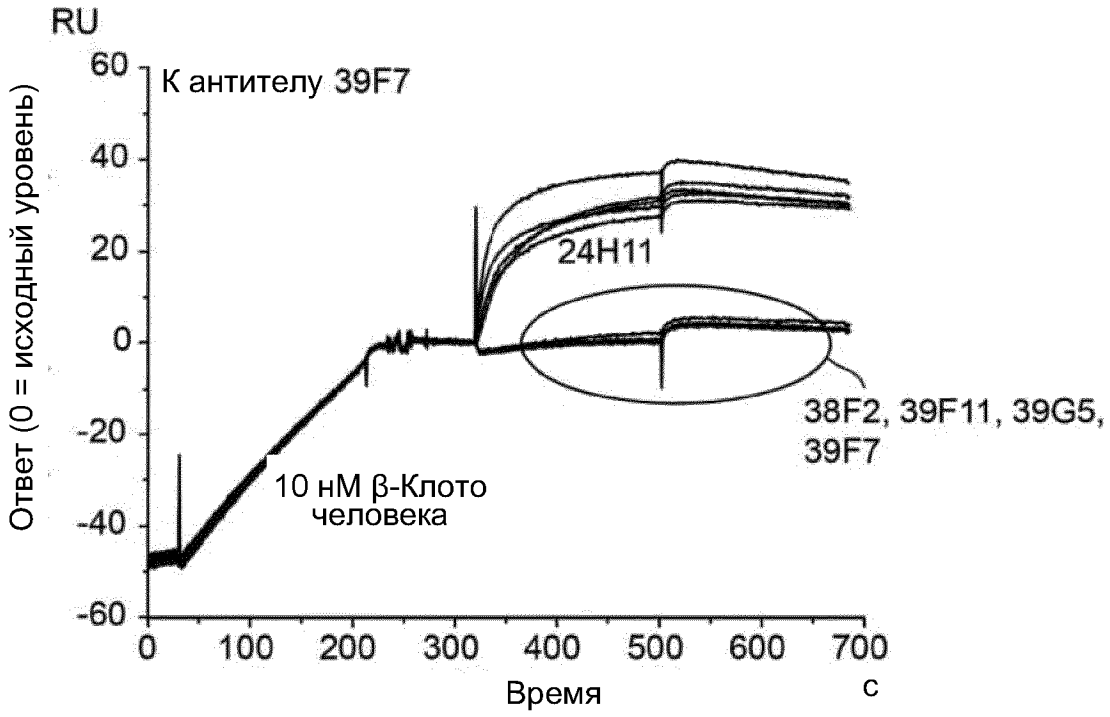

К антителу 24H11
RU
300
200
100
0
-100
-200
-300
-400
0
100
200
300
400
500
600
700
Время
Ответ (0 = исходный уровень)
37D3
20E8
38F2, 39F11,
39G5, 39F7
10 нМ β-Клото
человека

с

Фиг. 11E


К антителу 17D8
RU
400
300
200
100
0
-100
-200
-300
-400
-500
Ответ (0 = исходный уровень)
38F2, 39F11,
39G5, 39F7
37D3
10 нМ β-Клото
человека
0
100
200
300
400
500
600
700
Время
с

Фиг. 11F

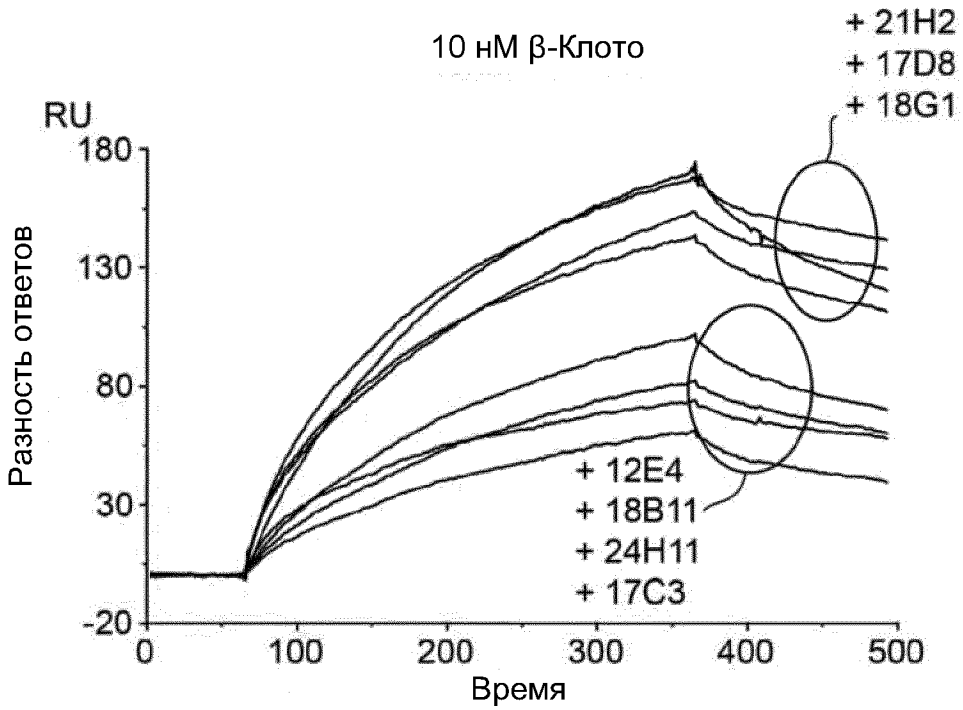

RU
60
40
20
0
-20
-40
-60
К антителу 39F7
24H11
38F2, 39F11, 39G5,
39F7
10 нМ β-Клото
человека
Ответ (0 = исходный уровень)
0
100
200
300
400
500
600
700
Время
с

Фиг. 11G

Резюме по сортировке антител по связываемому эпитопу

Группа 24H11: 2ая кампания - 24H11, 17C3, 16H7, 20D4, 21B4.22H5, 23F8, 21H2, 18B11; 3^{я} кампания - 40D2, 46D11
Группа 17D8: 2ая кампания - 17D8, 12C11, 26H11. 12E4, 18G1; 3^{я} кампания - 37D3
Группа 39F7: 3^{я} кампания - 39F7, 38F2, 39F11. 39G5
Группа 20E8: 2ая кампания - 20E8

Фиг. 12


10 нМ β-Клото
+ 21H2
+ 17D8
+ 18G1
+ 12E4
+ 18B11
+ 24H11
+ 17C3
RU
180
130
80
30
-20
Разность ответов
0
100
200
300
400
500
Время

Фиг. 13A

Легкая цепь			
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
20D4	VK1|A30	JK4	---L----------I--------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC
46D11	VK1|L5	JK5	----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
40D2=36F2=39C2	VK2|A18	JK1	-F----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
37D3	VK2|A19	JK2	----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
18B11 LC#1	VK2|A19	JK3	----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
12C11	VK3|A27	JK4	----------
18G1	VK3|A27	JK4	----------
17D8	VK3|A27	JK4	----------
21B4	VK3|A27	JK4	----------
21H2	VK3|A27	JK4	----------
26H11	VK3|A27	JK4	----------
12E4	VK3|A27	JK4	----------
39F7=47E3=38F2	VK3|A27	JK4	----------
39F11=41H5=37G3=39G8	VK3|A27	JK4	----------
39G5	VK3|A27	JK4	----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
18B11 LC#2	VK3|L2	JK1	----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC
16H7=23F8	VL3|3h	JL3	----------Q------
24H11	VL3|3h	JL3	----------Q------
22H5	VL3|3h	JL3	----------Q------
17C3	VL3|3h	JL3	----------Q------

Фиг. 13B

Тяжелая цепь			
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLT
20D4	VH1|124	JH6	----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
17C3	VH2|226	JH6	----------
22H5	VH2|226	JH6	----------
16H7=23F8	VH2|226	JH6	----------N
24H11	VH2|226	JH6	----------
46D11	VH2|226	JH6	------A----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
18B11	VH3|315	JH6	----------
37D3	VH3|315	JH6	--H-------A----------R
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
18G1	VH3|323	JH4	----------R----
12C11	VH3|323	JH4	----------R----
12E4	VH3|323	JH4	----------R----
17D8	VH3|323	JH4	----------Y----------
26H11	VH3|323	JH4	----------Y----------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
39F11=41H5=37G3=39G8	VH3|333	JH6	----------
39F7=47E3=38F2	VH3|333	JH6	----------
39G5	VH3|333	JH6	----------V------
	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS
40D2=36F2=39C2	VH4|431	JH5	----------

	Эмбрионального типа	Эмбрионального типа	FR1
			QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
21B4	VH4|459	JH6	----------
21H2	VH4|459	JH6	----------

Фиг. 13C

CDR1	FR2	CDR2
RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
----D--Y---	----------	-------
CDR1	**FR2**	**CDR2**
RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS
-------I---	----------	-------
CDR1	**FR2**	**CDR2**
KSSQSLLHSDGKTYLY	WYLQKPGQSPQLLIY	EVSSRFS
-------Q--------	--------P-H----	---N---
CDR1	**FR2**	**CDR2**
RSSQSLLHSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LGSNRAS
----------F--	----------	---D---
CDR1	**FR2**	**CDR2**
RSSQSLLHSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LGSNRAS
-------YY--FT---	-F--------H----	-------
CDR1	**FR2**	**CDR2**
RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASSRAT
----NFD--S--	----------	-------
----NFD-----	----------	-T-----
-------GN---	----------	-------
--------T---	-H------GL-----	-------
--------T---	-H------GL-----	-------
-------GN---	----------	-------
----NFD-N---	----------	-------
--------T---	----------	-------
--------T---	--------S----	-------
--------T---	----------	---F---
CDR1	**FR2**	**CDR2**
RASQSVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASTRAT
------N----	----------	-V-----
CDR1	**FR2**	**CDR2**
GGNNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVLVIY	YDSDRPS
-------E---	----------V-	D------
-------E---	----------V-	D------
-------Q---	----------V-	D------
-------Q---	----------V-	D------

Фиг. 13D

CDR1	**FR2**	**CDR2**
ELSMH	WVRQAPGKGLEWMG	GFDPEDGETIYAQKFQG
D----	----------	----------
CDR1	**FR2**	**CDR2**
NARMGVS	WIRQPPGKALEWLA	HIFSNDEKSYSTSLKS
-------	----------	----------
-------	----------	----------
-------	----------	----------
-------	----------	----------N
------N	----------	----------
CDR1	**FR2**	**CDR2**
NAWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG
D----	----------	----------
-----	----------	----------
CDR1	**FR2**	**CDR2**
SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGSGGSTYYADSVKG
T----	----------	G-----V--H-------
T----	----------	G-----V---------
T----	----------	G-----V---------
T----	----------	------V---------
T----	----------	------V--N-------
CDR1	**FR2**	**CDR2**
SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYDGSNKYYADSVKG
---I-	----------	-------D--------
N--I-	----------	-------I--------
---I-	----------	-------D---G-----
CDR1	**FR2**	**CDR2**
SGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG	YIYYSGSTYYNPSLKS
----N--	----------	N----------

CDR1	**FR2**	**CDR2**
SYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYNPSLKS
--F--	-----A-------	R--T----------
-----	-----A-------	R--T----------

Фиг. 13E

FR3	CDR3	FR4
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC		
----------V----------	LQHNSYPLT	FGGGTKVEIE
FR3	**CDR3**	**FR4**
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC		
----------	QQANDFPIT	FGQGTRLEIK
FR3	**CDR3**	**FR4**
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		
----------	MQSIQLPRT	FGQGTKVEIK
FR3	**CDR3**	**FR4**
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		
----------E----------L---	MQALQTPCS	FGQGTKLEIK
FR3	**CDR3**	**FR4**
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		
--------V----------	MQSLQTPFT	FGPGTKVDIK
FR3	**CDR3**	**FR4**
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC		
----------M---	QQCGSSPLT	FGGGTKVEIK
--------I---------N--------M---	QQYGGSPLT	FGGGTEVEIK
----------	QQYGSAPLT	FGGGTKVEIK
----------	QQYGSSFT	FGGGTRVEIK
----------	QQYGSSFT	FGGGTRVEIK
----------M---	QQYGSSPLT	FGGGSKVEIK
----N----------M---	QQYGSSPLT	FGGGTKVEIK
----------	QQSGSSPLT	FGGGTEVEIK
----------	QQSGSSPLT	FGGGTKVEIK
----------	QQSGSSPLT	FGGGTKVEIK
FR3	**CDR3**	**FR4**
GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC		
----------R----------	QQYNNWPPT	FGQGTKVEIK
FR3	**CDR3**	**FR4**
GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC		
----------	QVWDGNSDHVV	FGGGTKLTVL
----------	QVWDGNSDHVV	FGGGTKLTVL
----------	QVWDNTSDHVV	FGGGTKLTVL
----------	QVWDSSSDHVV	FGGGTKLTVL

Фиг. 13F

FR3	CDR3	FR4
RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRS EDTAVYYCAT		
-I----------S	IVVVPAAIQSYYYYYGMGV	WGQGTTVTVSS
FR3	**CDR3**	**FR4**
RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPV DTATYYCAR		
----------	ILLLGAYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
----------	ILLVGAYYYCGMDV	WGQGTTVTVSS
----------I----------	SVVTGGYYYDGMDV	WGQGTTVTVSS
----------I----------	SVVTGGYYYDGMDV	WGQGTTVTVSS
----------	VRIAGDYYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
FR3	**CDR3**	**FR4**
RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCTT		
----------F--S	TYSSGWYVWDYYGMDV	WGQGTTVTVSS
----------E---I-	DRVLSYYAMAV	WGQGTTVTVSS
FR3	**CDR3**	**FR4**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAK		
----------	SLIVVIVYALDH	WGQGTLVTVSS
----------	SLIVVIVYALDY	WGQGTLVTVSS
----------	SLIVVIVYALDY	WGQGTLVTVSS
----------	SLIVVMVYVLDY	WGQGTLVTVSS
----------	SLIVVMVYVLDY	WGQGTLVTVSS
FR3	**CDR3**	**FR4**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR		
----------	DRAAAGLHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
----------	DRAAAGLHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
----------	DRAAAGLHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
FR3	**CDR3**	**FR4**
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR		
----------R----------	ENIVVIPAAIFAGWFDP	WGQGTLVTVSS

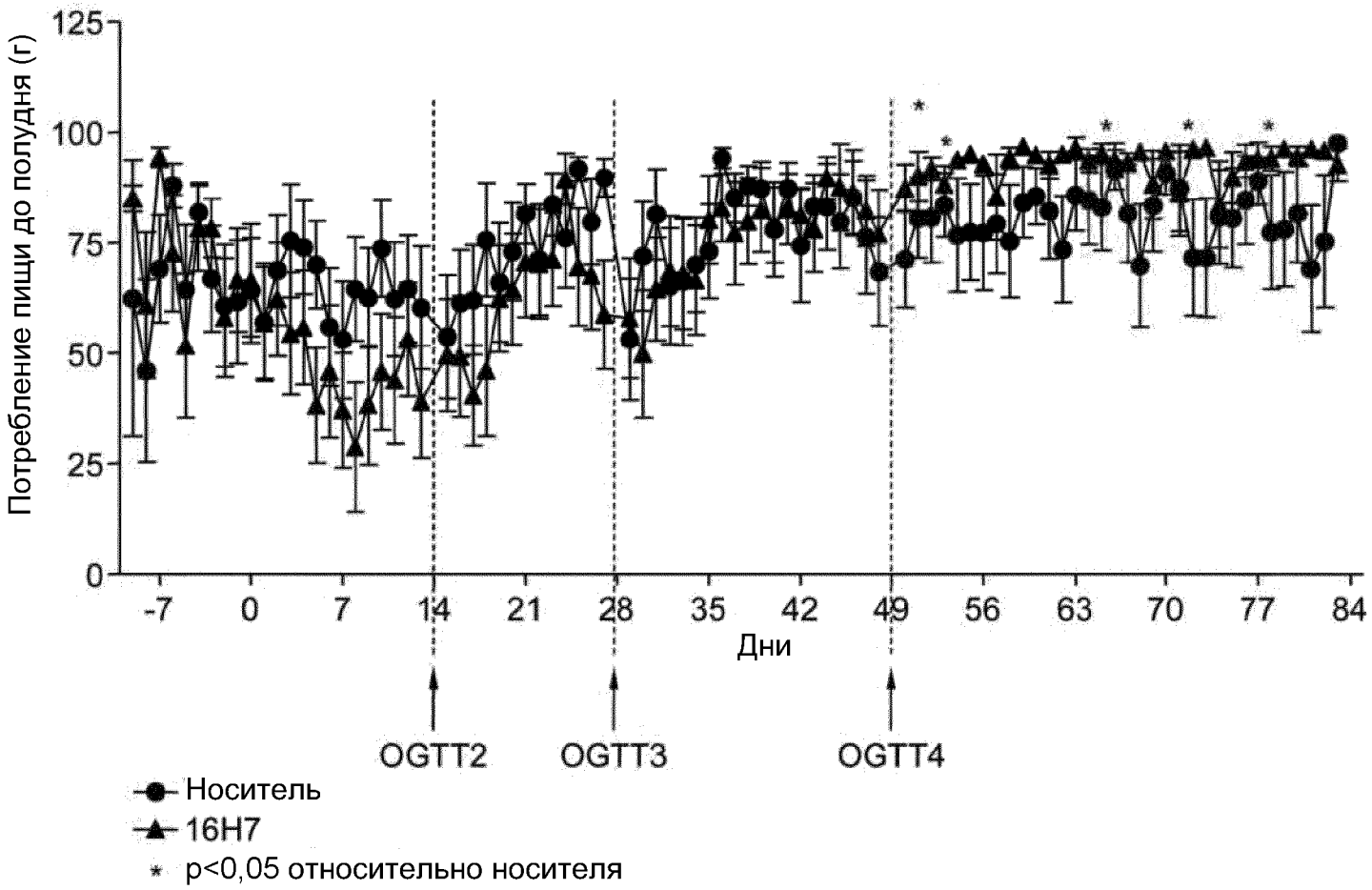
FR3	CDR3	FR4
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR		
---M-I----------	DPDGDYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
---M-K----------R----------	DPDGDYYYYGMDV	WGQGTSVTVSS

Фиг. 14

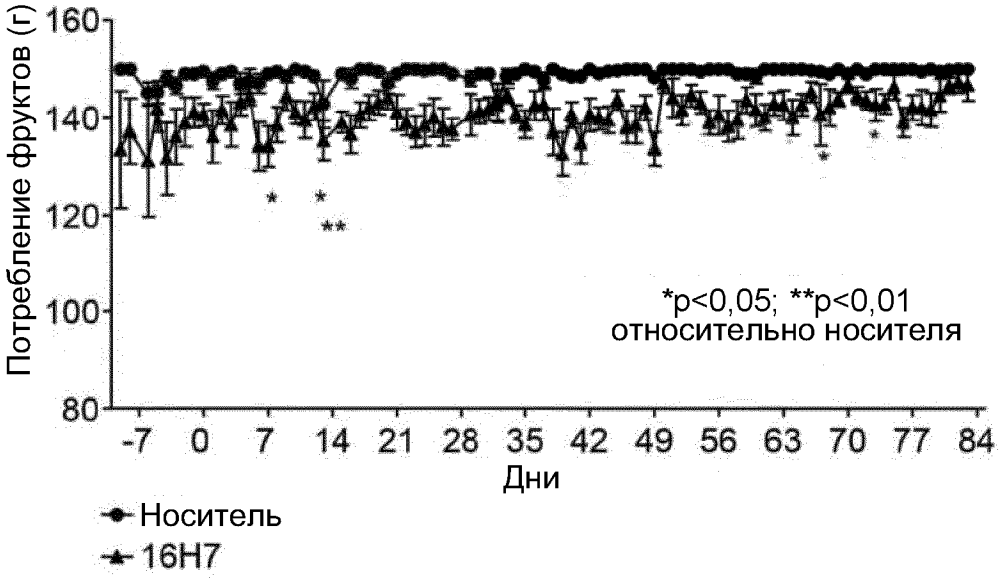


ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

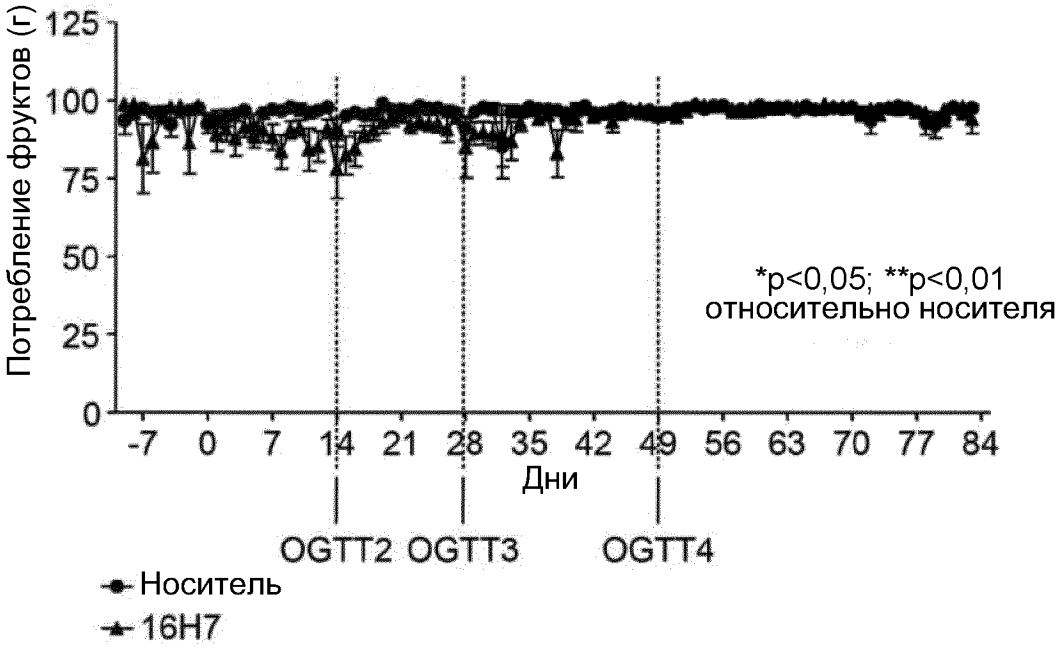
Фиг. 15


Потребление пищи до полудня (г)
125
100
75
50
25
0
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
84
Дни
OGTT2
OGTT3
OGTT4
Носитель
16H7
* p<0,05 относительно носителя

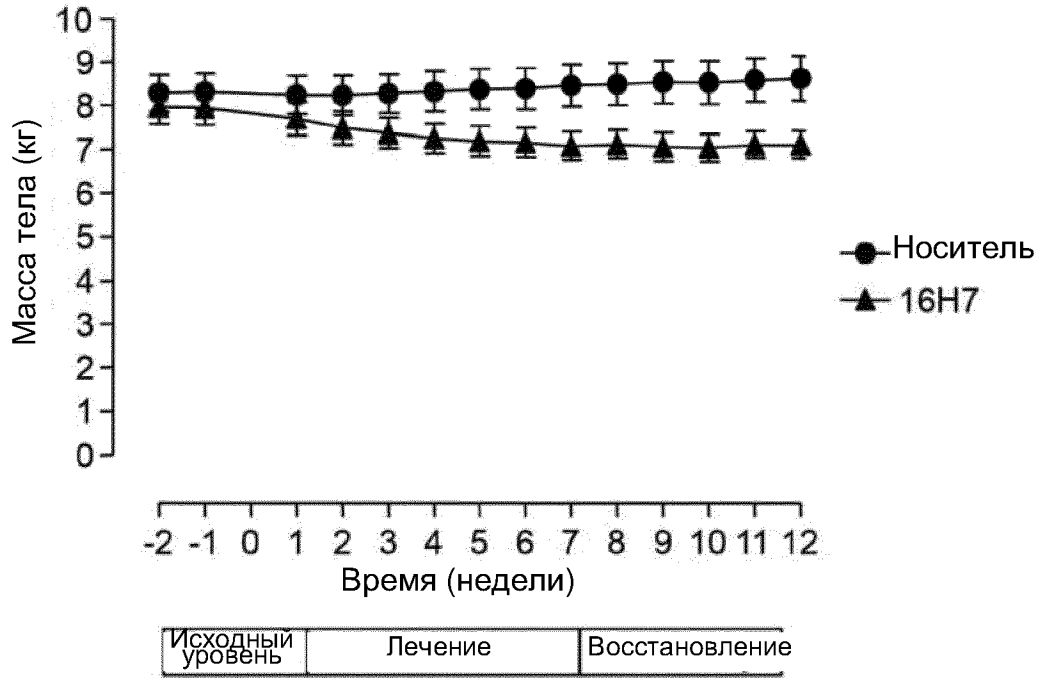
Фиг. 16A



Фиг. 16B

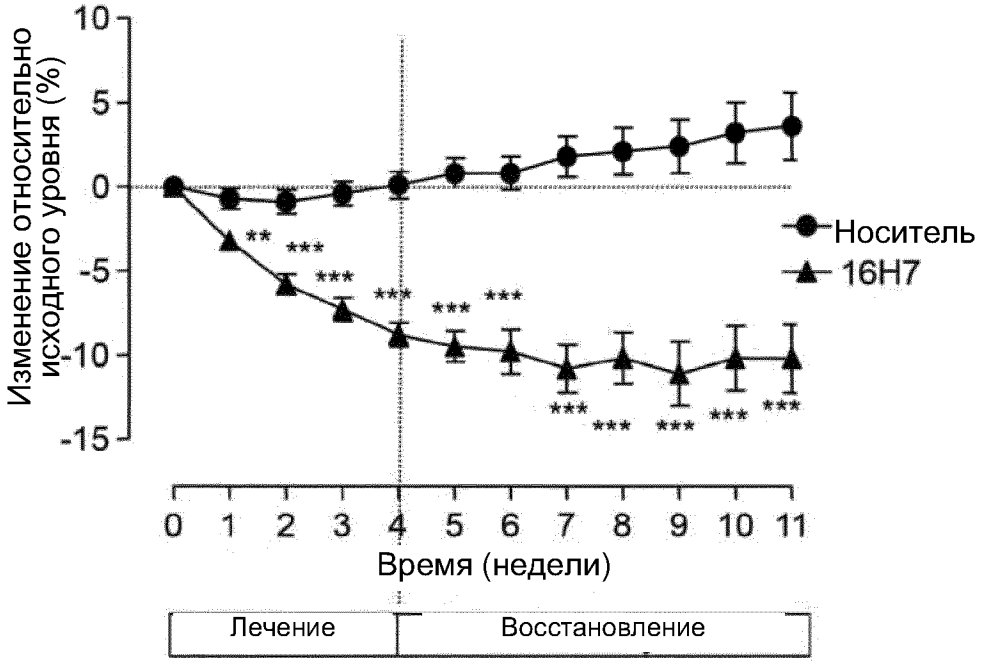


Фиг. 17A



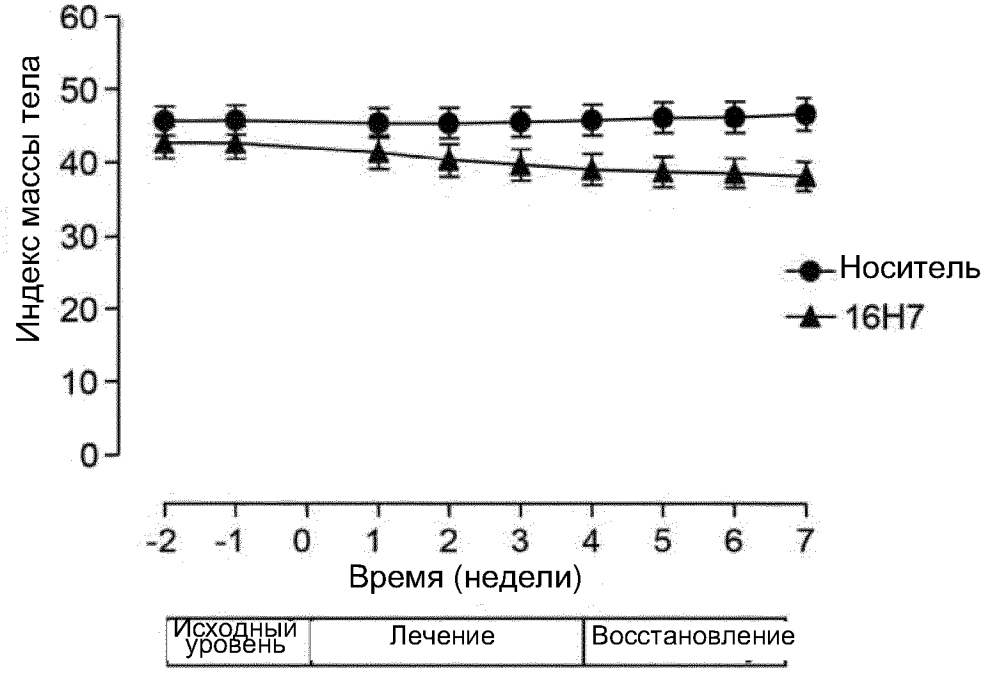
*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 17B



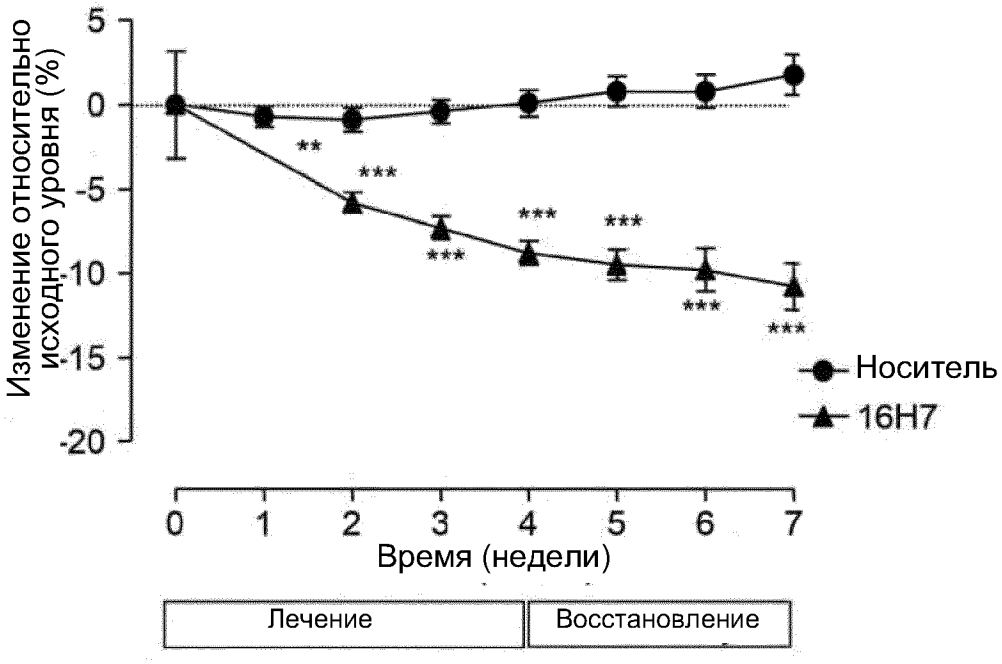
*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 18A



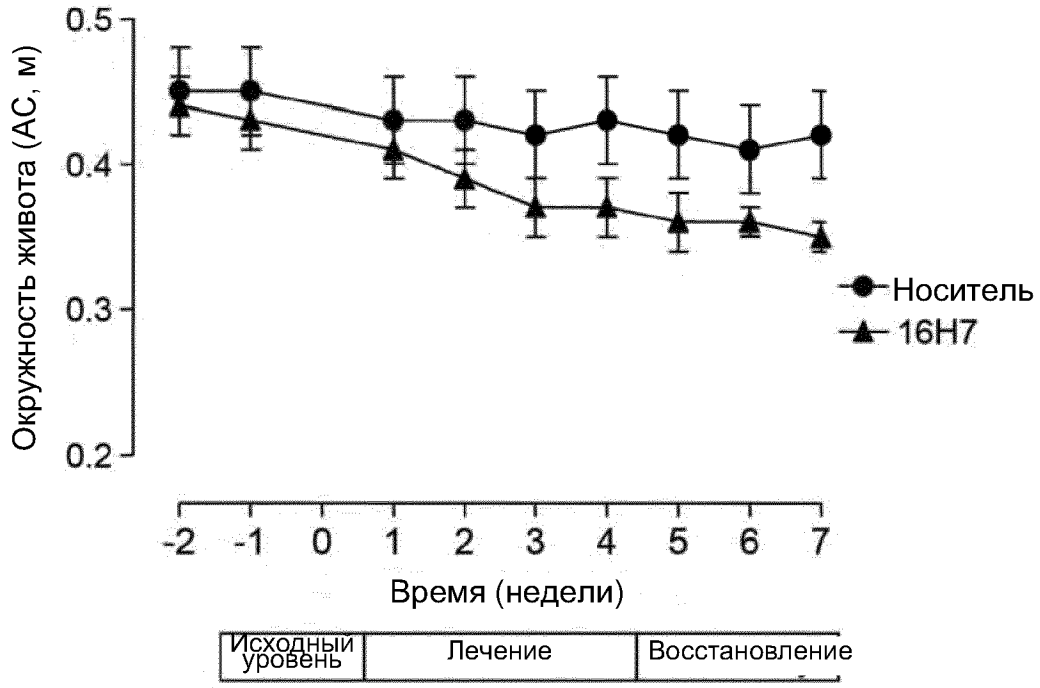
*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 18B



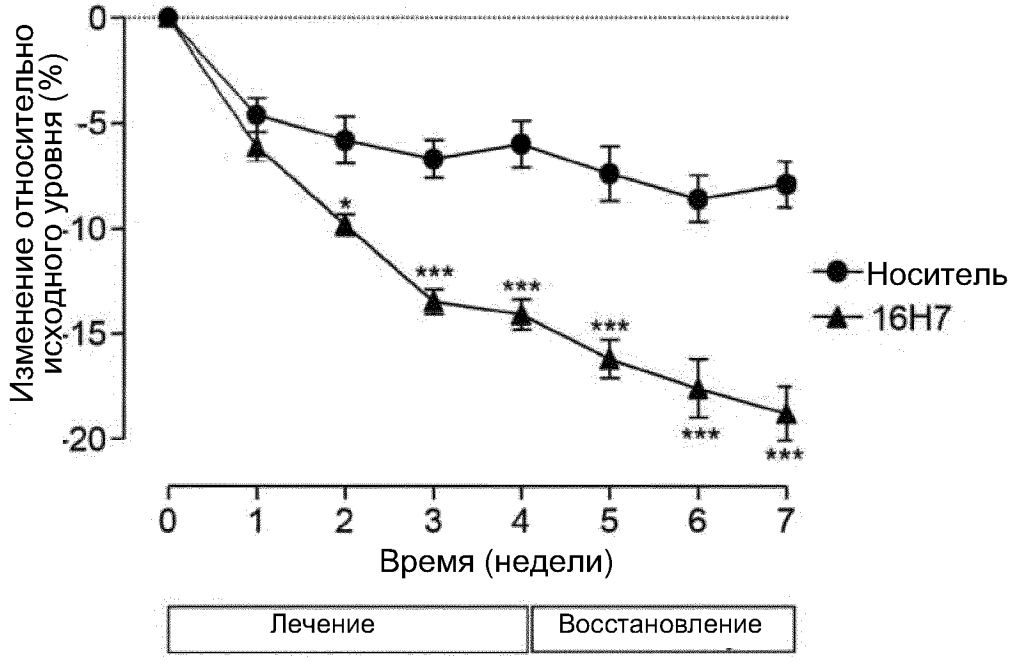
*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 19A



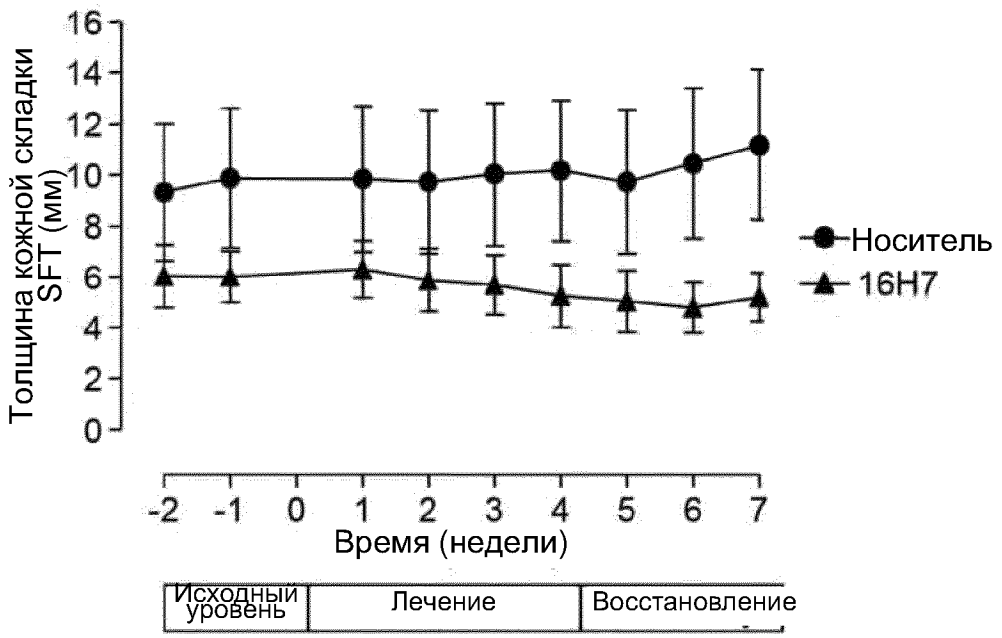
*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 19B



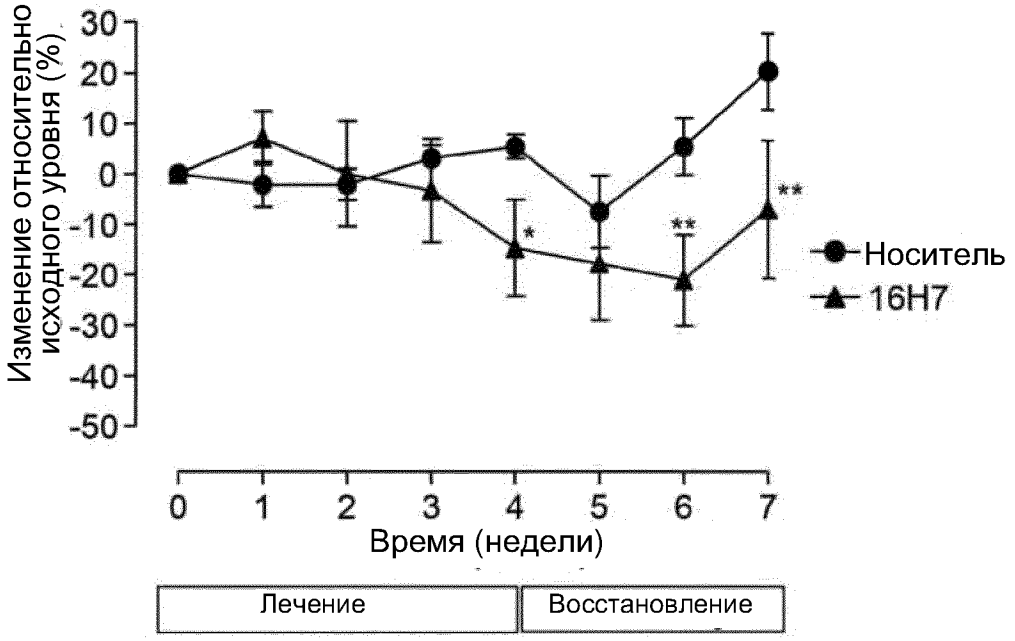
*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 20A



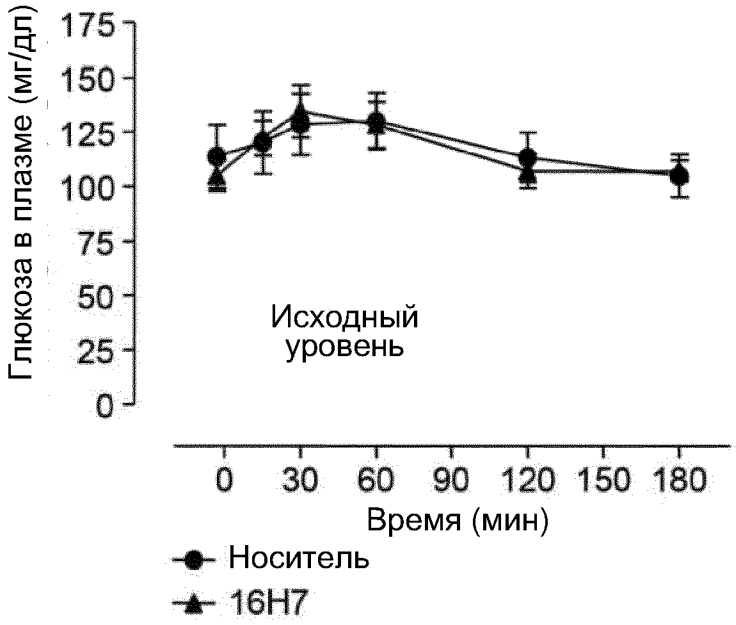
*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 20B

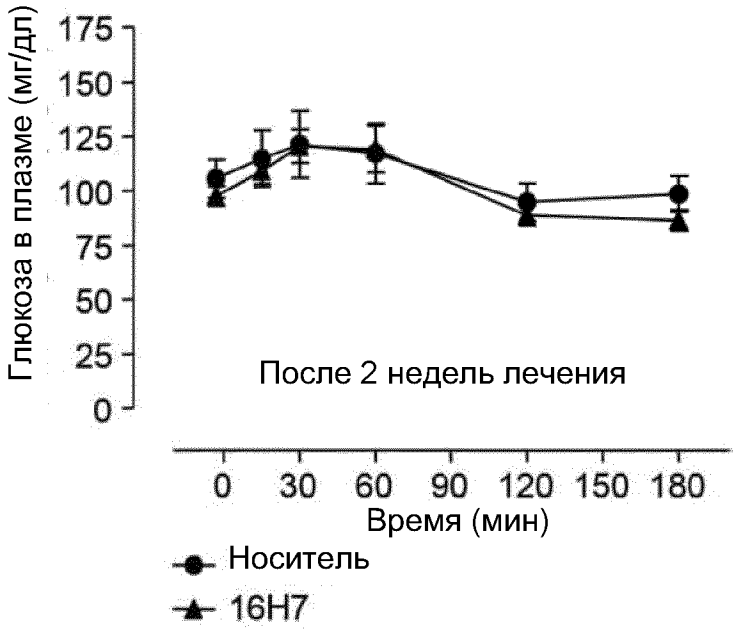


*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 относительно носителя

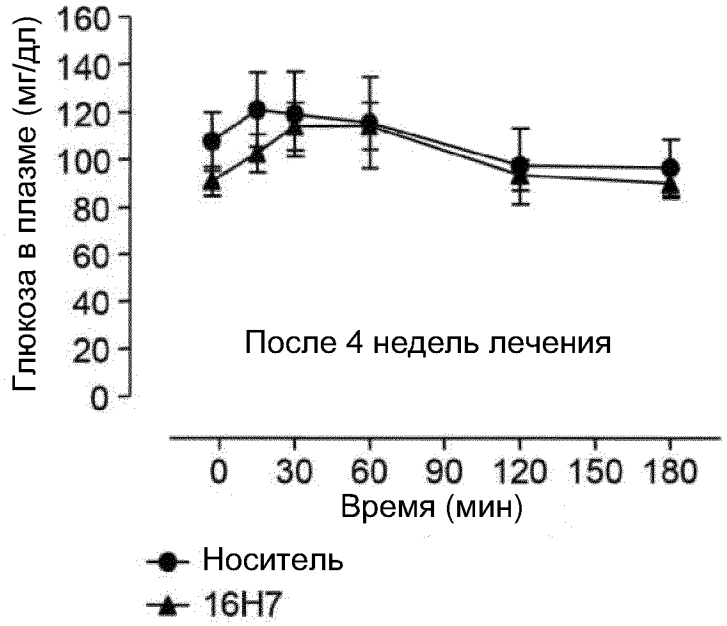
Фиг. 21A



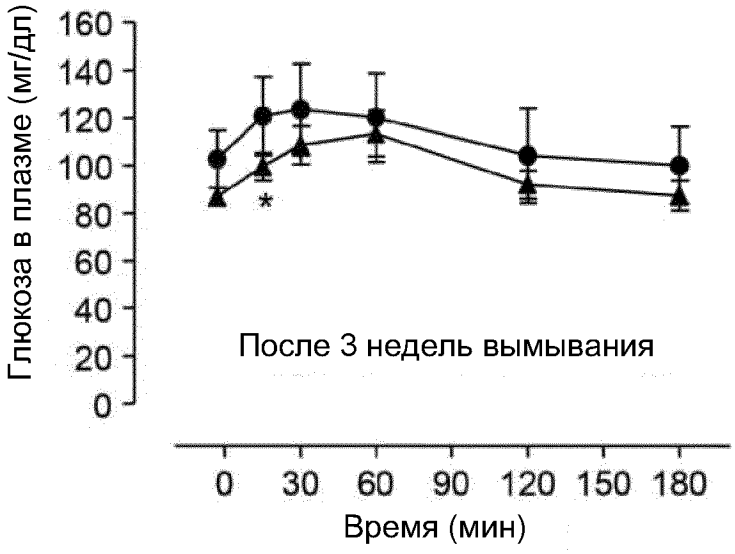
Фиг. 21B



Фиг. 21C

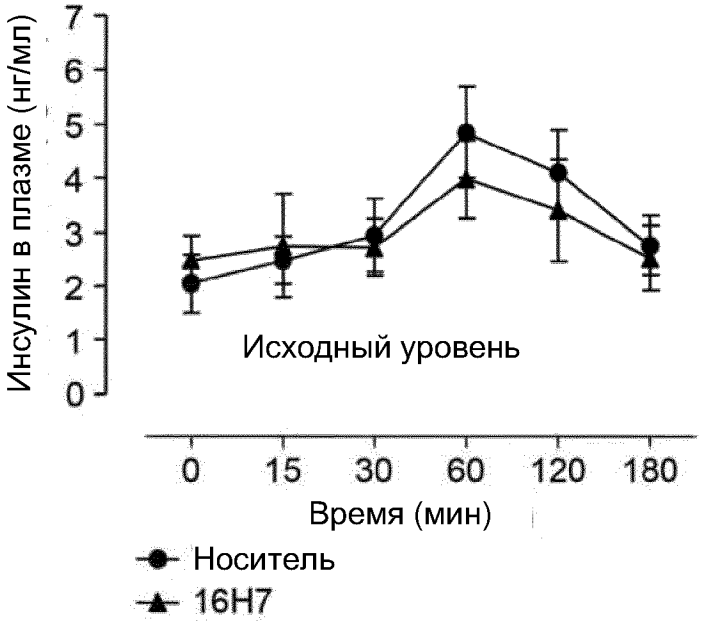


Фиг. 21D

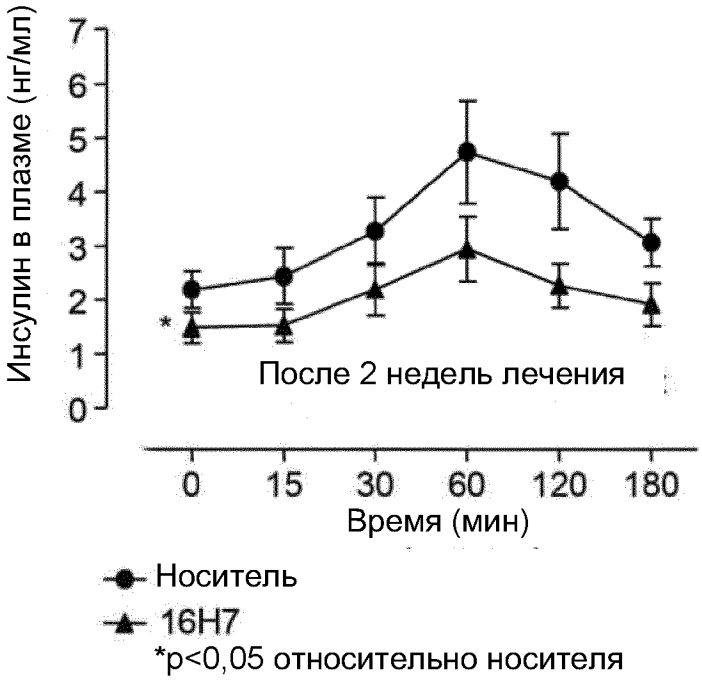


*p<0,05 относительно носителя

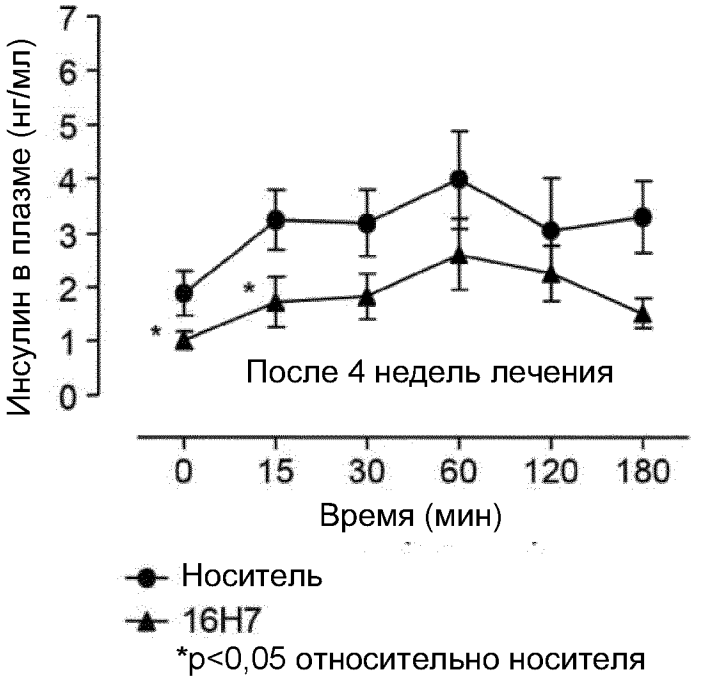
Фиг. 22A



Фиг. 22B

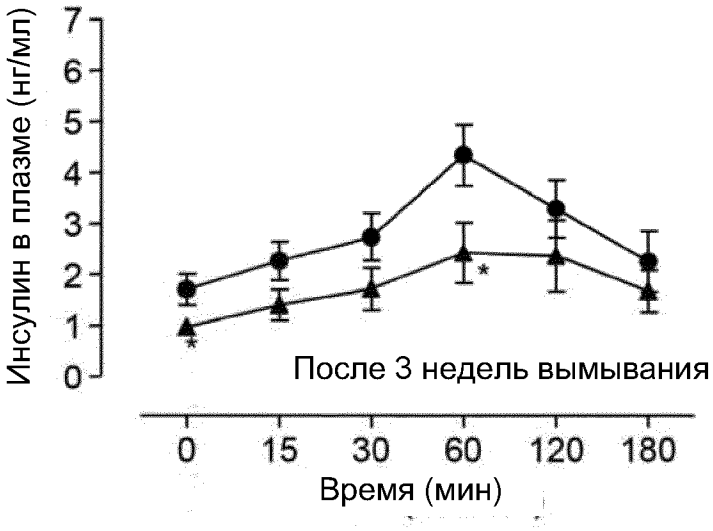


Фиг. 22C



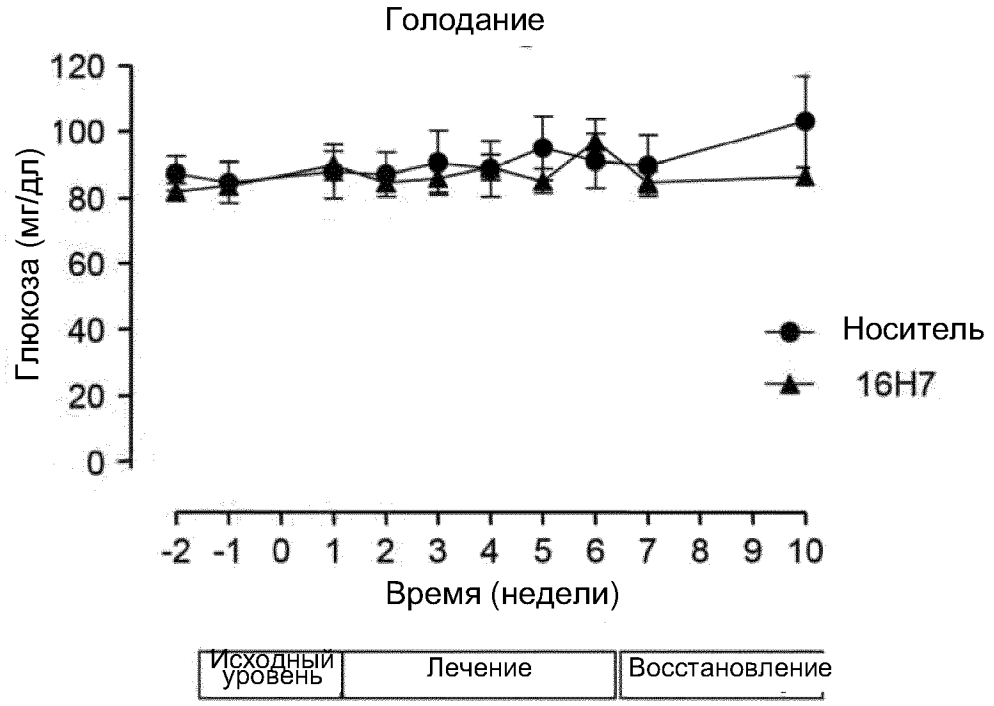
*p<0,05 относительно носителя

Фиг. 22D

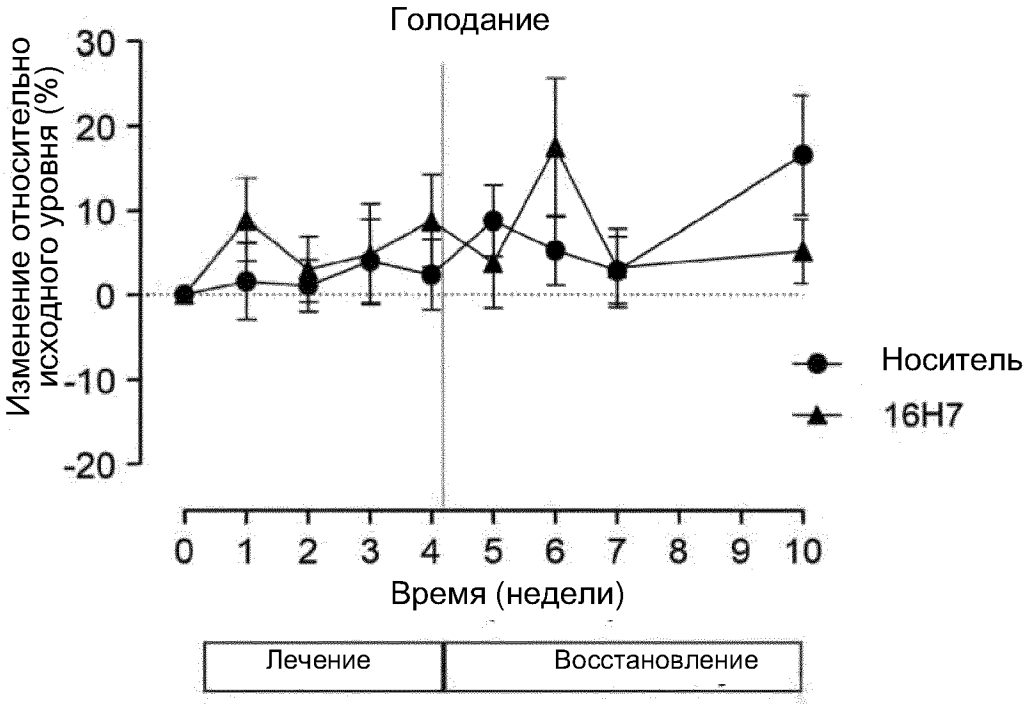


*p<0,05 относительно носителя

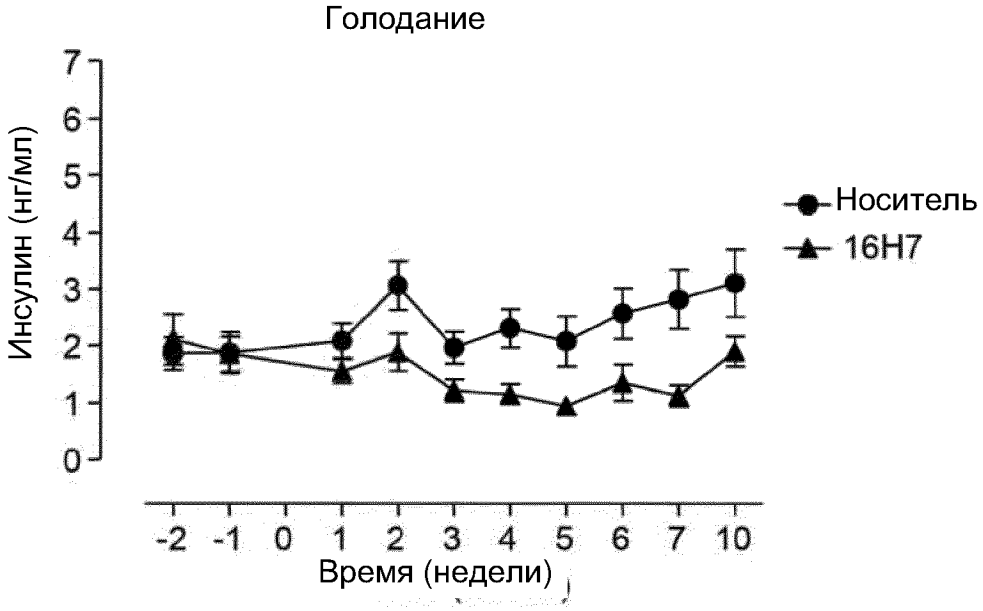
Фиг. 23A



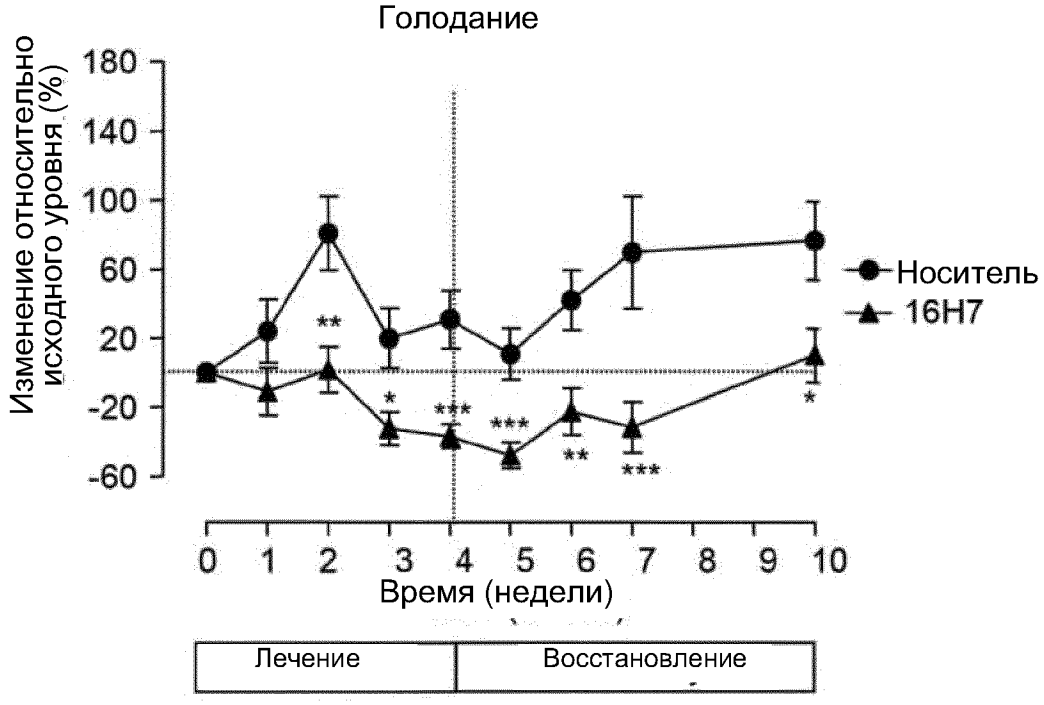
Фиг. 23B



Фиг. 24A

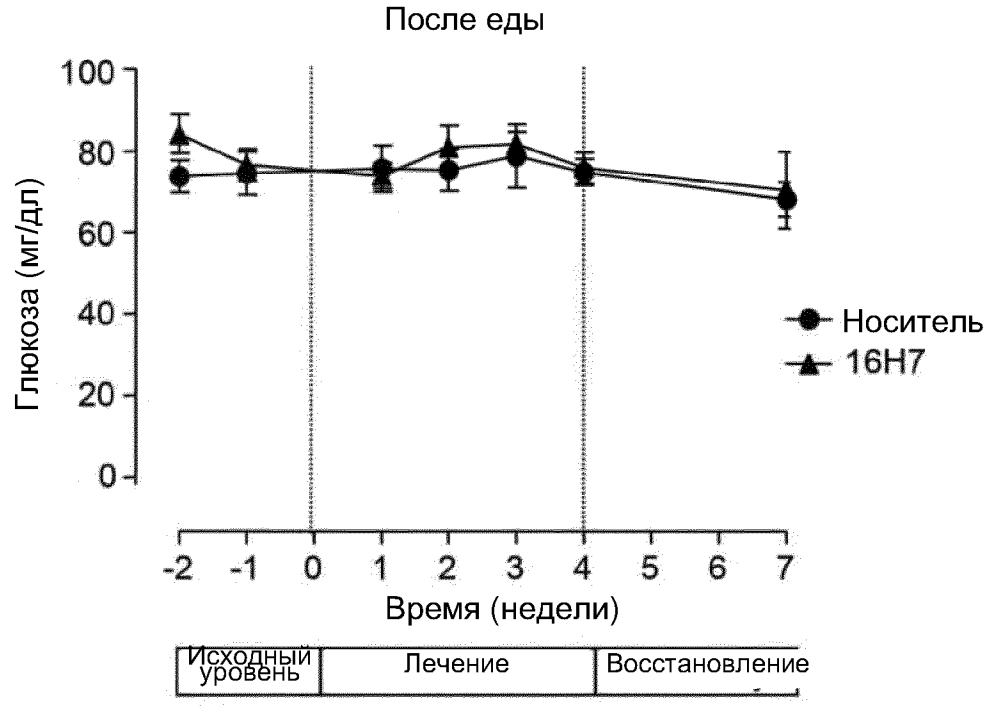


Фиг. 24B



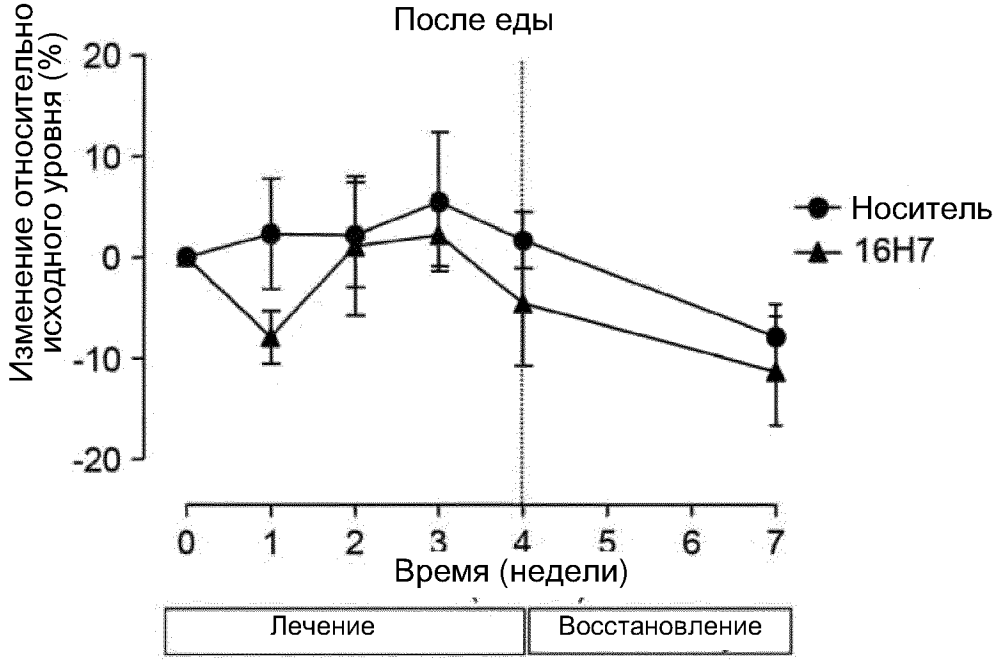
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 25A

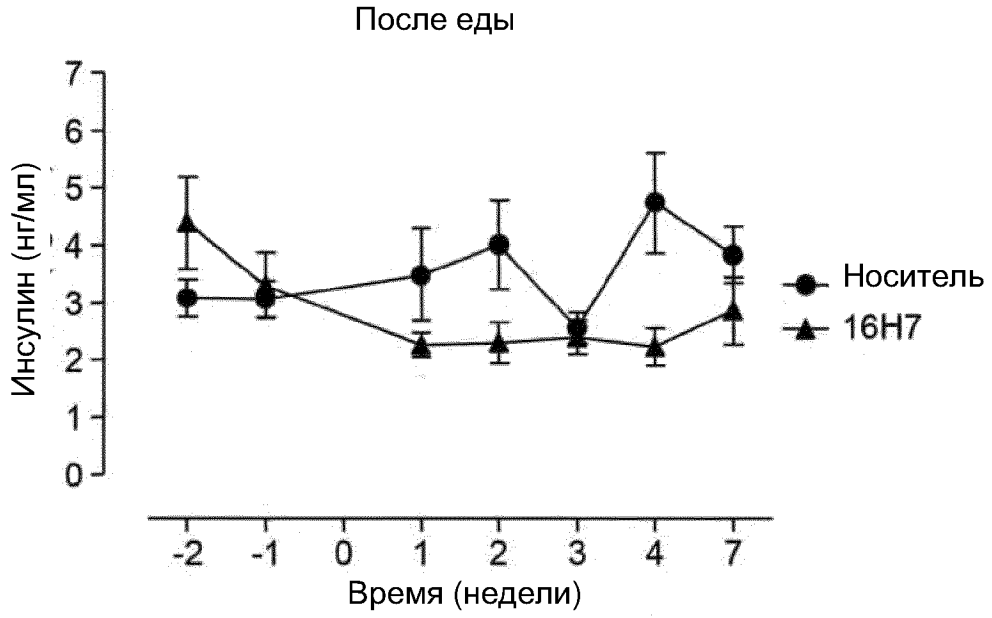


*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 25B

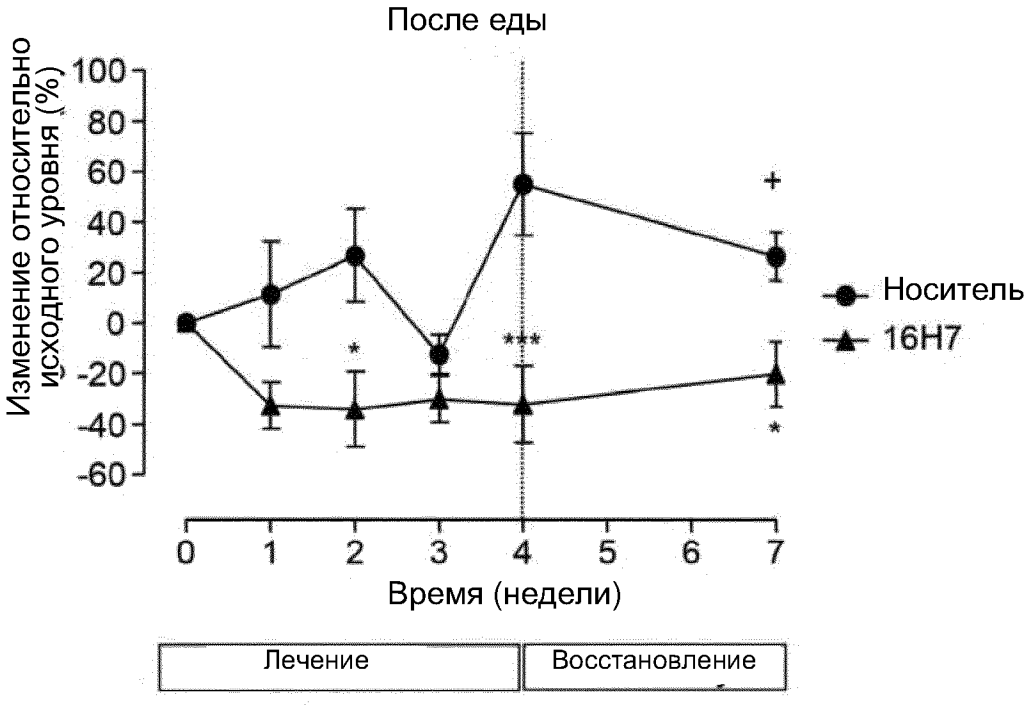


Фиг. 26A

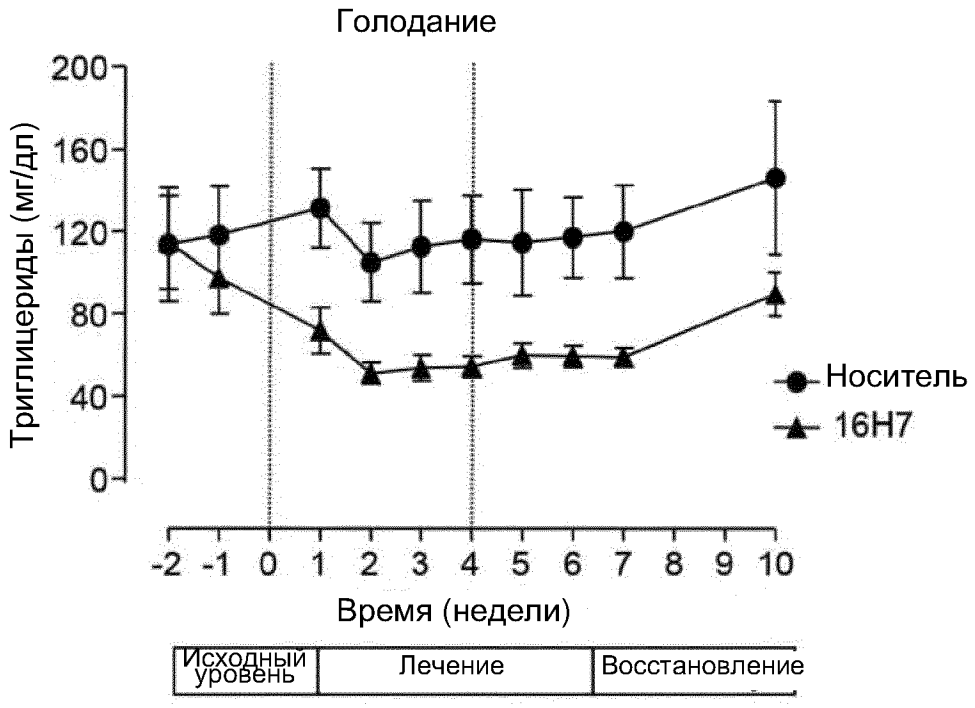


*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 26B

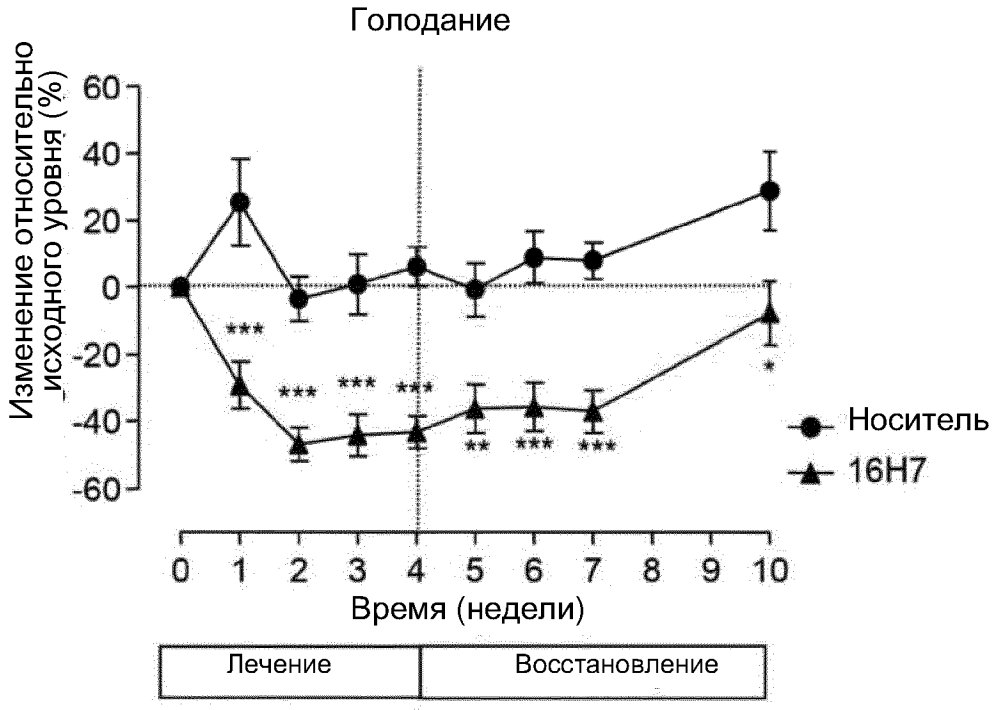


Фиг. 27A

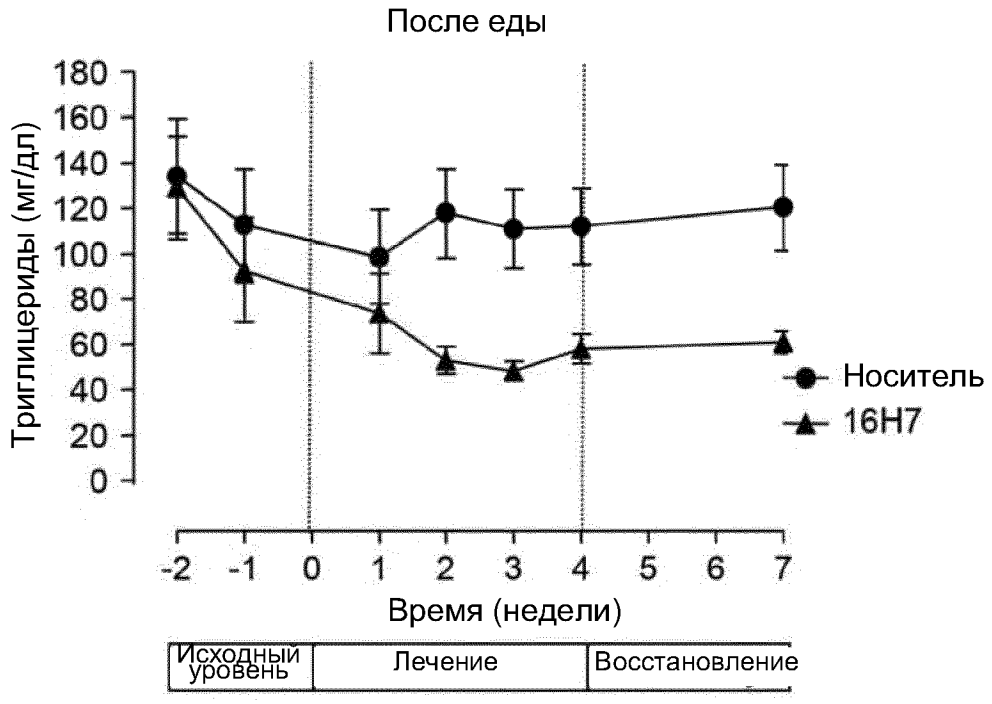


*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 относительно носителя

Фиг. 27B

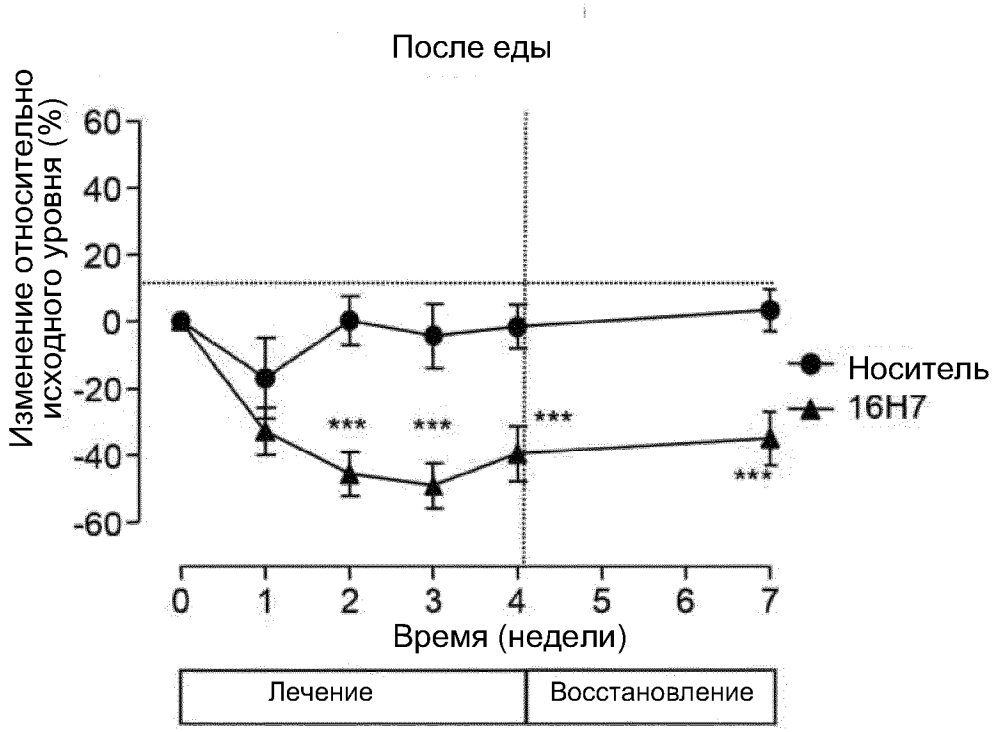


Фиг. 28A

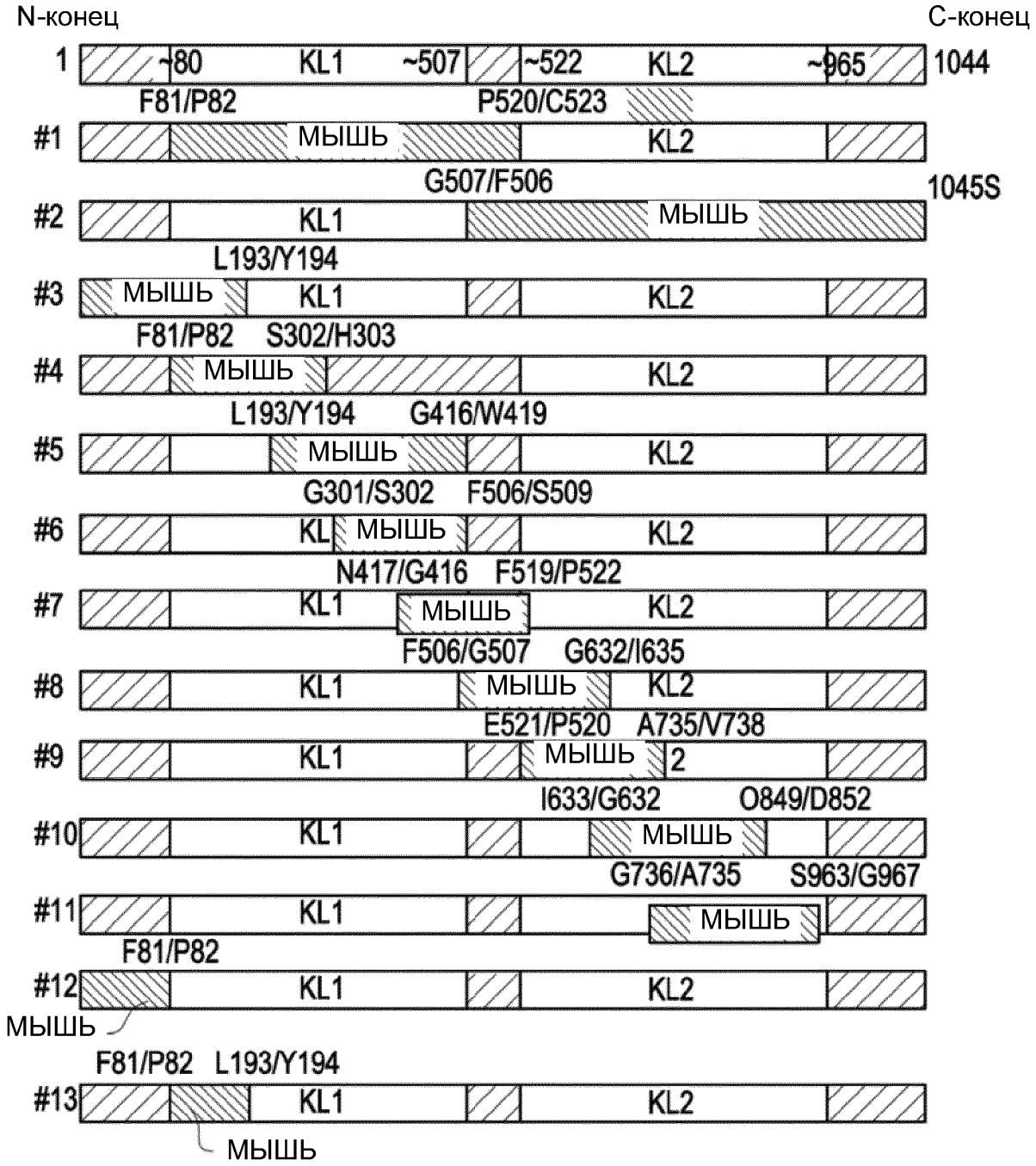


*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 относительно носителя

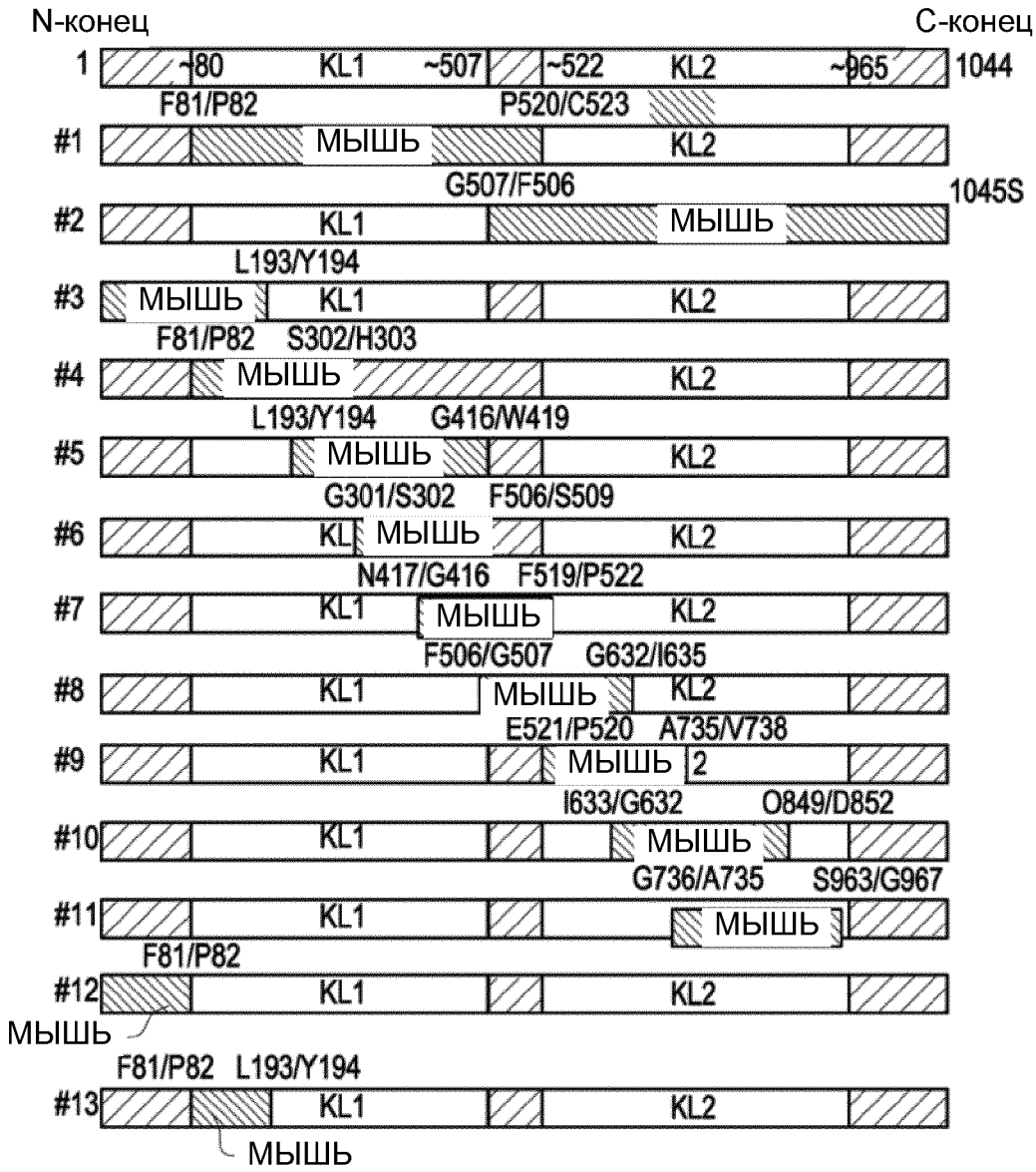
Фиг. 28B



Фиг. 29

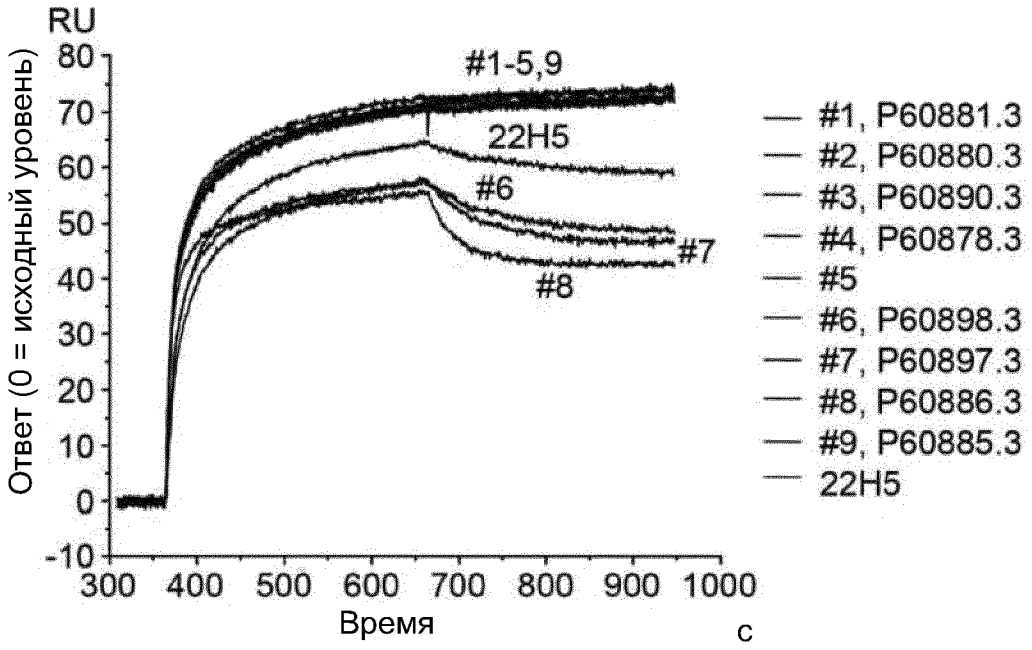

N-конец
C-конец
1
~80
KL1
~507
~522
KL2
~965
1044
F81/P82
P520/C523
#1
МЫШЬ
KL2
G507/F506
1045S
#2
KL1
МЫШЬ
L193/Y194
#3
МЫШЬ
KL1
KL2
F81/P82
S302/H303
#4
МЫШЬ
KL2
L193/Y194
G416/W419
#5
МЫШЬ
KL2
G301/S302
F506/S509
#6
KL
МЫШЬ
KL2
N417/G416
F519/P522
#7
KL1
МЫШЬ
KL2
F506/G507
G632/I635
#8
KL1
МЫШЬ
KL2
E521/P520
A735/V738
#9
KL1
МЫШЬ
2
I633/G632
O849/D852
#10
KL1
МЫШЬ
G736/A735
S963/G967
#11
KL1
МЫШЬ
F81/P82
#12
KL1
KL2
МЫШЬ
F81/P82
L193/Y194
#13
KL1
KL2
МЫШЬ

Фиг. 30

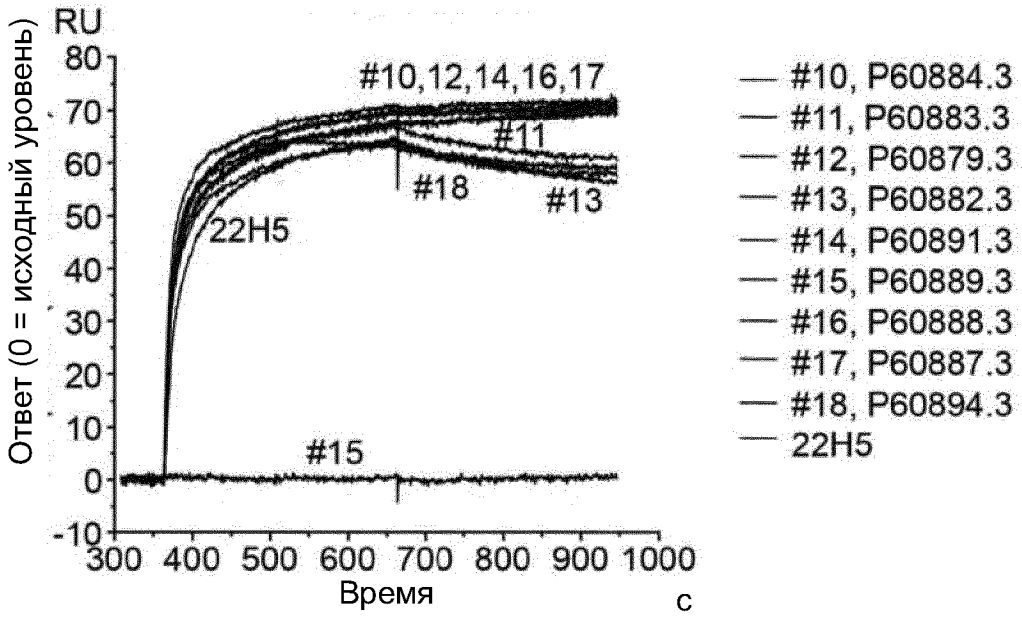


	FGF21	16H7	37D3	39F7
1	+	+	+	+
	+	-	-	-
#1	+	+	+/-	+
#2	+	-	-	+/-
#3	+	+	+	+
#4	+	-	-	-
#5	+	-	+	-
#6	+	-	-	-
#7	+	+	+	+
#8	+	+	+	+
#9	+	+	+	+
#10	+	+/-	+/-	+/-
#11	+	-	+	+
#12	+	+	+	+
#13	+	-	-	-

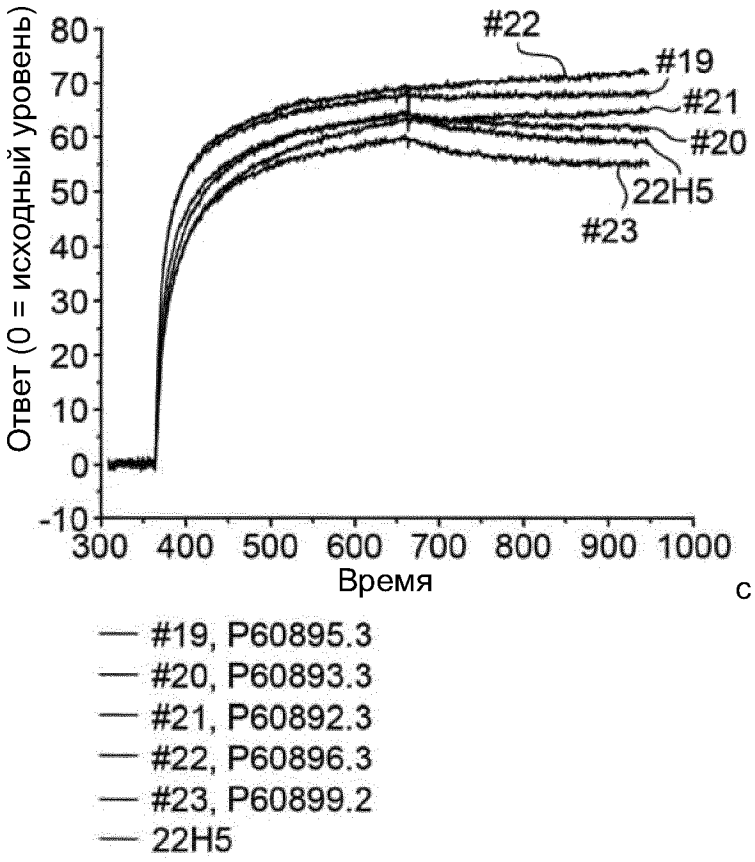
Фиг. 31A



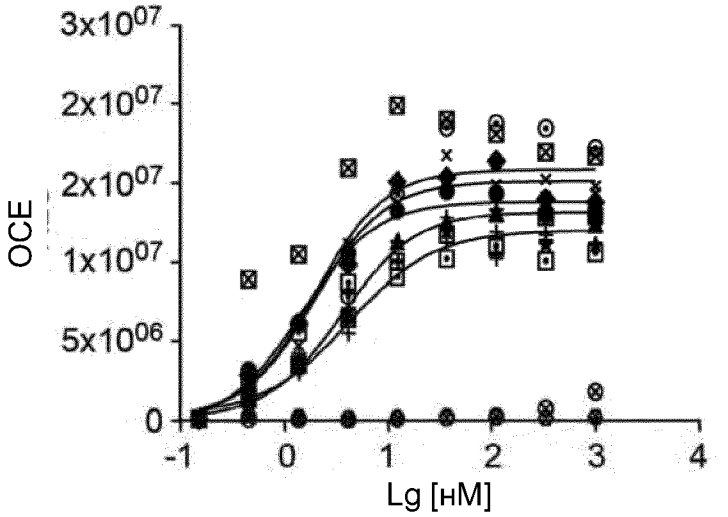
Фиг. 31B



Фиг. 31C

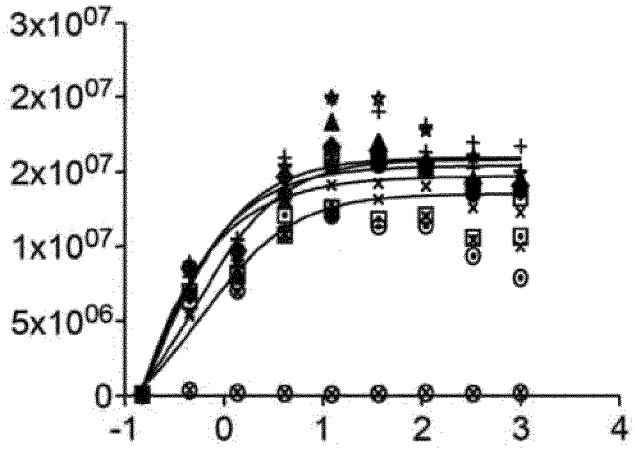

Ответ (0 = исходный уровень)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
300
400
500
600
700
800
900
1000
Время
с
#22
#19
#21
#20
22H5
#23
— #19, P60895.3
— #20, P60893.3
— #21, P60892.3
— #22, P60896.3
— #23, P60899.2
— 22H5

Фиг. 32A



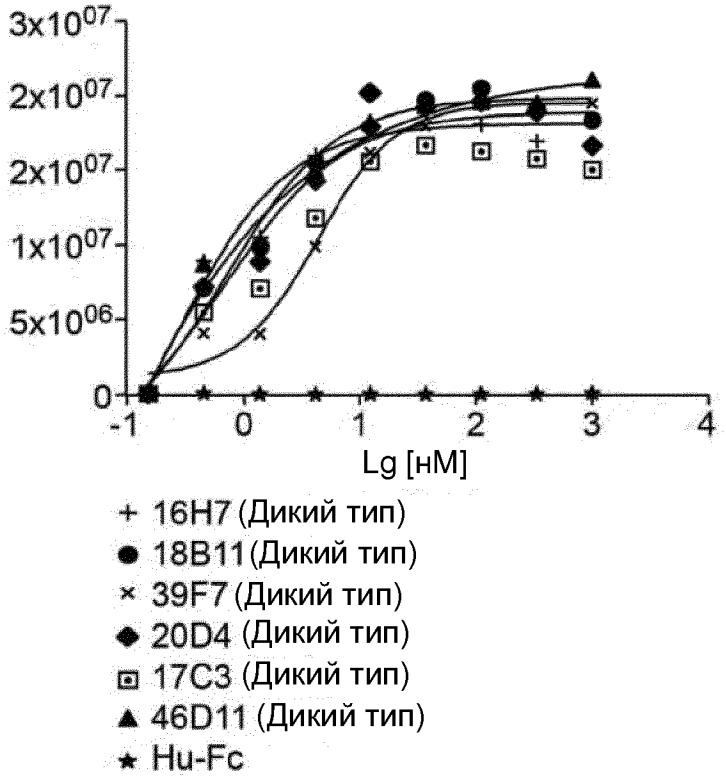
+ 1: 16H7 I92T HC
● 2: 16H7 E17Q,V25F,I92T HC
× 3: 16H7 D97R,P98A,V99E HC
◆ 4: 16H7 E17Q,V25F,I92T,T144L H
⊡ 8:16H7 DY132 HC
▲ 9: 16H7 I92K HC
★ 10: 16H7S109I HC
+ 11: 16H7 D134S HC
× 12: 16H7 D97R, P98A, V99E, S10
⊙ 13: 16H7 (ss/desK:G4S)8
⊡ 14: 16H7 E17Q, V25F, I92T, S10
⊗ 15: 16H7 INSY132
⊠ 5: 16H7 (Дикий тип)
● Hu-Fc

Фиг. 32B

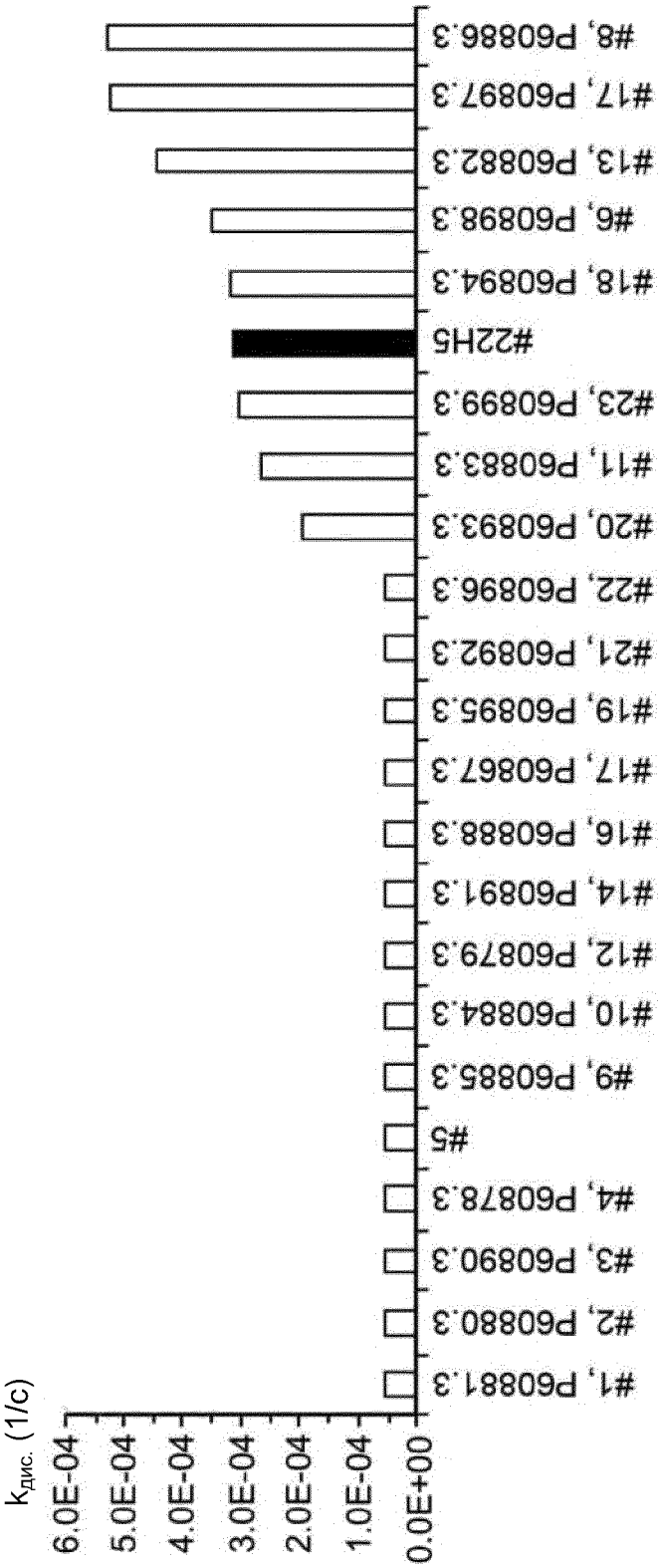


+ 16: 16H7 V25F HC
● 17: 16H7 V25F, I92T HC
× 18: 16H7 D58Y LC
◆ 19: 16H7 D58A LC
⊡ 20: 16H7 D58A, D110A LC
▲ 21: 16H7 D110A LC
★ 22: 16H7 D17K LC
+ 5: 16H7 (Дикий тип)
× 6: 22H5 S134A LC
⊙ 7: 22H5 N111Q HC
⊡ 23: 22H5 (Дикий тип)
⊗ Fc, отрицат.

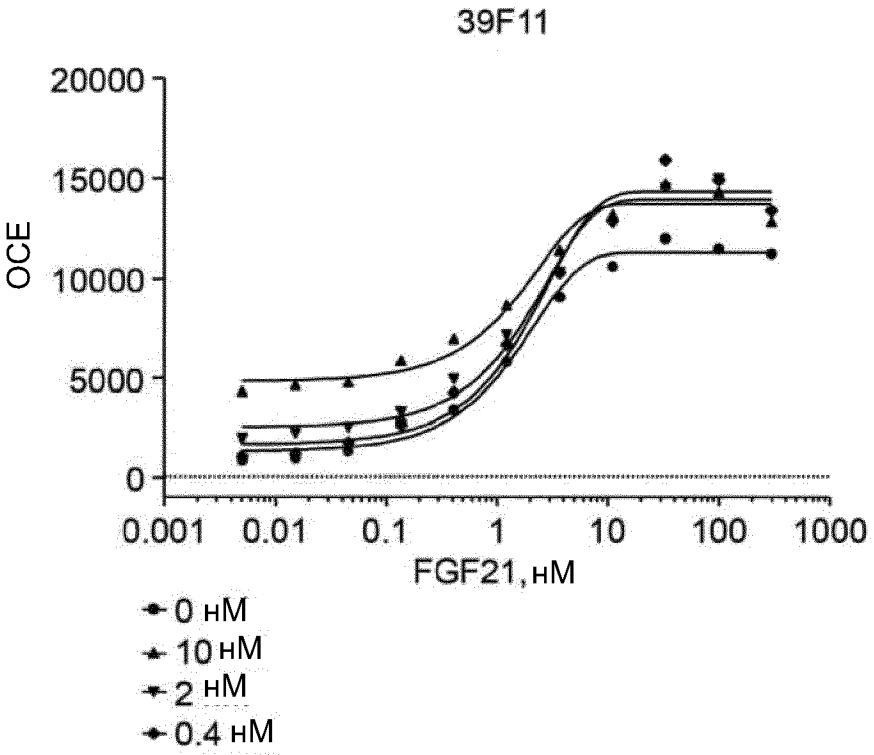
Фиг. 32C


3x10^07
2x10^07
2x10^07
1x10^07
5x10^06
0
-1
0
1
2
3
4
Lg [нМ]
16H7 (Дикий тип)
18B11 (Дикий тип)
39F7 (Дикий тип)
20D4 (Дикий тип)
17C3 (Дикий тип)
46D11 (Дикий тип)
Hu-Fc

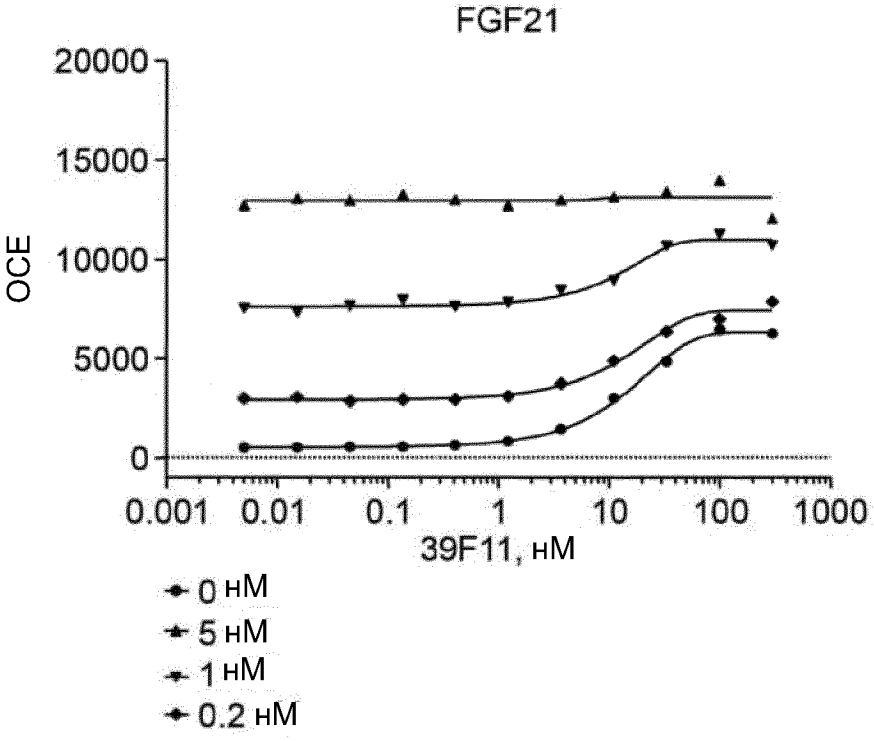
Фиг. 33


$k_{дис.}$ (1/с)
6.0E-04
5.0E-04
4.0E-04
3.0E-04
2.0E-04
1.0E-04
0.0E+00
#1, P60881.3
#2, P60880.3
#3, P60890.3
#4, P60878.3
#5
#9, P60885.3
#10, P60884.3
#12, P60879.3
#14, P60891.3
#16, P60888.3
#17, P60867.3
#19, P60895.3
#21, P60892.3
#22, P60896.3
#20, P60893.3
#11, P60883.3
#23, P60899.3
#22H5
#18, P60894.3
#6, P60898.3
#13, P60882.3
#17, P60897.3
#8, P60886.3

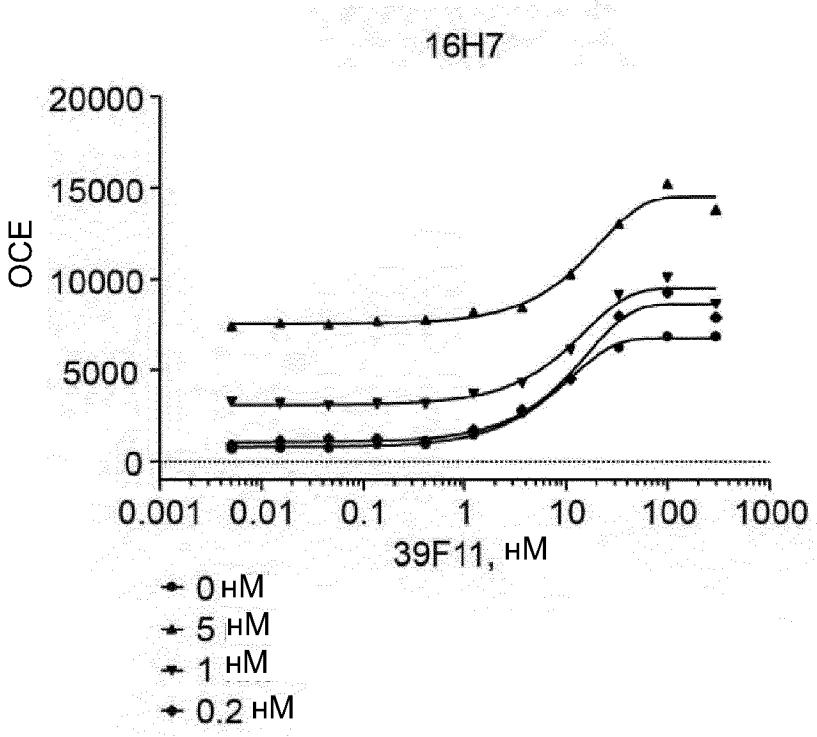
Фиг. 34A



Фиг. 34B



Фиг. 35A



Фиг. 35B

