

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992348 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.24

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.30

(54) АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С Jagged1

(31) 62/512,805

(32) 2017.05.31

(33) US

(86) PCT/US2018/035209

(87) WO 2018/222770 2018.12.06

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

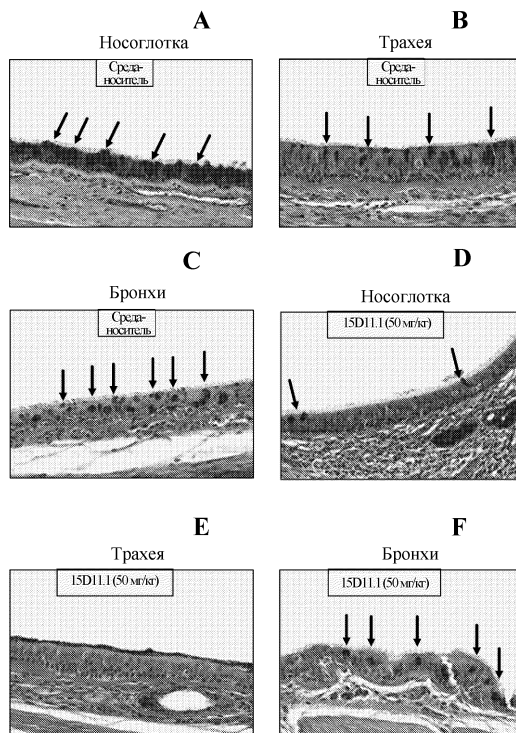
(72) Изобретатель:

Беннетт Брайан Д., Кинг Чедвик Т.,
Филлипс Джонатан (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предусмотрены способы лечения состояний, связанных с заболеванием легкого, с применением антиген-связывающего белка, специфичного в отношении полипептида Jagged1.



201992348

A1

A1

201992348

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559413EA/045

АНТИГЕН–СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С JAGGED1

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] Настоящее изобретение относится к лечению или уменьшению интенсивности заболевания легкого с применением антиген–связывающего белка, специфичного в отношении Jagged1.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Сигнальный путь Notch регулирует разнообразные функции клеток (Kopan et al, Cell 137, 216–233 (2009)). Было идентифицировано четыре рецептора Notch у млекопитающих, т. е. Notch 1–4, которые имеют общие основные структурные элементы, которые включают внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Аналогично канонические лиганды Notch разделяют некоторые признаки структурного сходства, но также был идентифицирован ряд неканонических лигандов Notch (Kopan et al., Cell 137, 216–233 (2009)). Пять канонических лигандов у млекопитающих представляют собой Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4, Jagged1 и Jagged2. Связывание лиганда Notch с внеклеточным доменом рецептора Notch активирует сигнальный каскад, который начинается с протеолитического расщепления по внеклеточному сайту S2 посредством альфа–секретазы семейства ADAM (дезинтегрин и металлопротеаза). Расщепление по S2 сопровождается протеолитическим расщеплением посредством гамма–секретазы по внутриклеточному сайту S3, что приводит к высвобождению внутриклеточного домена и последующим событиям, которые в конечном итоге активируют Notch–зависимые транскрипционные факторы, такие как Hes1 и Hey.

[3] Аберрантная экспрессия Notch и передача сигнала были связаны с рядом заболеваний, включая рак (Koch et al., Cell. Mol. Life Sci. 64, 2746–2762 (2007)). Очевидно, что по–прежнему существует необходимость в средствах, которые имеют клинические свойства, которые являются оптимальными для разработки в качестве терапевтических средств. Настоящее изобретение, описанное в данном документе, соответствует данной необходимости и предусматривает другие преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта с состоянием, связанным с заболеванием легкого, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антиген–связывающего белка, который специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью Jagged1. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок вводят внутривенно, посредством распыления или посредством подкожной инъекции.

[5] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антиген–связывающему белку, который специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью Jagged1.

[5] В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, мультиспецифическое антитело или фрагмент такого антитела. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок представляет собой Fab–фрагмент, Fab'–фрагмент или F(ab')₂–фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок представляет собой антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок относится к типу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок соединен с группой мечения.

[6] В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124 и 130; CDRL2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125 и 131; CDRL3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126 и 132; CDRH1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256 и 262; CDRH2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 137, 143, 149, 155, 161, 167, 173, 179, 185, 191, 197, 203, 209, 215, 221, 227, 233, 239, 245, 251, 257 и 263; и CDRH3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258 и 264.

[7] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где каждая из CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 и SEQ ID NO: 144; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 150; SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 и SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162; SEQ ID NO: 34,

SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 174; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 180; SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 и SEQ ID NO: 186; SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191 и SEQ ID NO: 192; SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 210; SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215 и SEQ ID NO: 216; SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 и SEQ ID NO: 222; SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227 и SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 и SEQ ID NO: 234; SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239 и SEQ ID NO: 240; SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245 и SEQ ID NO: 246; SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 и SEQ ID NO: 252; SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257 и SEQ ID NO: 258; и SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 263 и SEQ ID NO: 264.

[8] В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент, и где антитело или его фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 331, 335, 339, 343, 347, и 351, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 268, 272, 276, 280, 284, 288, 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336, 340, 344, 348 и 352.

[9] В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент, и где антитело или его фрагмент содержат комбинацию переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 267, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 268; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 271, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 272; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 275, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 276; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 279, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 280; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 283, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 284; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID

NO: 287, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 288; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 291, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 292; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 295, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 296; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 299, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 300; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 303, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 304; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 307, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 308; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 311, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 312; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 315, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 316; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 319, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 320; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 323, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 324; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 327, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 328; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 331, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 332; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 335, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 336; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 339, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 340; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 343, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 344; вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 347, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 348; и вариательной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 351, и вариательной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 352.

[10] В одном аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты является функционально связанной с регуляторной последовательностью.

[11] В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

[12] В одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

[13] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, продуцируемым клеткой-хозяином согласно настоящему изобретению.

[14] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения антитела или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, включающему стадию получения антитела или его фрагмента из клетки-хозяина, которая секретирует

антитело.

[15] В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[16] В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антиген-связывающему белку, который конкурирует за связывание с Jagged1 человека с антителом или его фрагментом в соответствии с настоящим изобретением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[17] Фиг. 1A–1F. На фиг. 1A–1D показано окрашивание Шифф-йодной кислотой/альциановым синим нестимулированных культур ALI, необработанных или обработанных с помощью IgG1 (10 мкг/мл) или антитела к Jag-1 15D11.1 (10 мкг/мл или 1 мкг/мл). На фиг. 1E–1F показано количественное определение числа бокаловидных клеток и процентного содержания муцина в различных группах обработки. Несколько бокаловидных клеток присутствуют в исходном состоянии без стимуляции, а обработка антителом к Jag-1 (10 мкг/мл) снижает число бокаловидных клеток ниже исходного уровня.

[18] Фиг. 2A–2G. На фиг. 2A–2E показано окрашивание Шифф-йодной кислотой/альциановым синим нестимулированных или стимулированных IL-13 культур ALI, необработанных или обработанных с помощью IgG1 (10 мкг/мл) или антитела к Jag-1 15D11.1 (10 мкг/мл или 1 мкг/мл). На фиг. 2F и 2G – количественное определение числа бокаловидных клеток и процентного содержания муцина в различных группах обработки. Большое количество бокаловидных клеток присутствует в случае стимуляции IL-13, и при этом обработка антителом к Jag-1 (10 мкг/мл или 1 мкг/мл) приводит к значимому снижению числа бокаловидных клеток и процентного содержания муцина.

[19] Фиг. 3A–3D. На фиг. 3A–3D показаны результаты qPCR для маркеров бокаловидных клеток MUC5AC; MUC5B и FOXA3 из нестимулированных или стимулированных IL-13 3D-культур бронхосфер, необработанных или обработанных с помощью IgG1 (10 мкг/мл) или антитела к Jag-1 (10 мкг/мл или 1 мкг/мл). IL-13 индуцировал дифференциацию бокаловидных клеток, и при этом обработка антителом к Jag-1 (10 мкг/мл и 1 мкг/мл), но не обработка IgG1 (10 мкг/мл) блокировала дифференциацию бокаловидных клеток.

[20] Фиг. 4A–4G. На фиг. 4A показано схематическое краткое описание плана исследования стимуляции OVA, на фиг. 4B–4E показано окрашивание Шифф-йодной кислотой легочных воздушных путей контрольных мышей, обработанных антителом к Jag-1 (15D11.1) или антителом к TSLP, на фиг. 4F и 4G показано количественное определение бокаловидных клеток и процентного содержания муцина в эпителии дыхательных путей в различных группах обработки. В обработанных контролем и обработанных антителом к TSLP дыхательных путях обнаружено большое количество бокаловидных клеток, и при этом группа, обработанная антителом к Jag-1, проявляет

снижение числа бокаловидных клеток и процентного содержания муцина.

[21] Фиг. 5А–5С. На фиг. 5А показано изменение веса тела для всех групп. Мыши, сенсibilизированные без применения и с применением ОVА, показаны по отдельности на графике на фиг. 5В и на фиг. 5С.

[22] На фиг. 6 показана оценка аффинности связывания mAb 15D11.1 человека к hJagged1 с hJagged1.

[23] На фиг. 7А–7С показана аффинность в отношении клеточной поверхности, определенная с помощью измерения равновесного показателя с применением KinExA.

[24] На фиг. 8А–8В показаны результаты анализа ELISA в отношении межвидовой реакционной способности и селективности 15D11.1 по отношению к членам семейства лигандов Notch.

[25] На фиг. 9 показано связывание 15D11.1 с клетками 293Т, трансфицированными Jagged–1 человека.

[26] На фиг. 10 показана межвидовая реакционная способность 15D11.1 по отношению к клеткам 293Т, трансфицированным Jagged–1 мыши.

[27] На фиг. 11 показано связывание 15D11.1 с клетками 293Т, трансфицированными Jagged–1 крысы.

[28] На фиг. 12 показано титрование дозы mAb 15D11.1 к Jagged–1 в ходе анализа с совместным культивированием в отношении активации Notch2 человека, индуцированного Jagged–1 человека.

[29] На фиг. 13 показана межвидовая реакционная способность 15D11.1 по отношению к Jagged–1 мыши.

[30] На фиг. 14А–14L показано титрование дозы mAb 15D11.1 к Jagged–1 в нестимулированных культурах бронхосфер.

[31] На фиг. 15А–15L показано титрование дозы mAb 15D11.1 к Jagged–1 в культурах бронхосфер, стимулированных IL–13 (1 нг/мл).

[32] На фиг. 16А–16В показана профилактическая дозировка антитела к Jag1, которая ингибирует экспрессию гена Nrg1p сигнального пути Notch и маркерного гена Muc5ac бокаловидной клетки в модели метаплазии бокаловидных клеток мыши, индуцированной посредством интратрахеальной доставки IL–13.

[33] На фиг. 17А–17С показана профилактическая дозировка антитела к Jag1, которая приводит к реснитчатому фенотипу эпителиальной клетки дыхательных путей и ингибирует метаплазию бокаловидных клеток в модели астмы, индуцированной овальбумином.

[34] На фиг. 18А–18D показана терапевтическая дозировка нейтрализующего Ab к Jag1 в модели астмы, индуцированной овальбумином, ингибирующая экспрессию гена секреторной клетки.

[35] На фиг. 19А–19В показано, что обработка антителом к Jag1 уменьшает слизистую обструкцию дыхательных путей в модели слизисто–обструктивного заболевания легкого у трансгенной мыши b–ENaC.

[36] На фиг. 20A–20F показана дозировка антитела к Jag1, ингибирующая уменьшение содержания муцина в дыхательном эпителии обезьян.

[37] На фиг. 21A–21B показана фармакокинетика антитела 15D11.1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[38] Применяемые в данном документе способы получения рекомбинантного полипептида и нуклеиновой кислоты, включая те, что в Примерах, в целом, как правило, представляют собой те, что указаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) или *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994), каждый источник из которых включен в данный документ посредством ссылки для любых целей.

[39] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны быть истолкованы как ограничивающие описываемый объект изобретения.

[40] Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, используемые применительно к настоящей заявке, будут иметь значения, которые обычно подразумеваются специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не предусмотрено контекстом, термины в единственном числе будут включать их множественное число, а термины во множественном числе будут включать их единственное число.

[41] Как правило, номенклатура, применяемая в связи с культивированием клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот и гибридизацией и их методиками, описанными в данном документе, хорошо известна и обычно применяется в данной области техники. Способы и методики согласно настоящей заявке, как правило, осуществляются в соответствии с традиционными способами, хорошо известными из уровня техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые приведены и рассмотрены по всему настоящему описанию, если не указано иное. 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), а также Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в данный документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и методики очистки выполняют в соответствии с инструкциями производителя, обычно осуществляемыми в данной области техники или как описано в данном документе. Терминология, используемая применительно к аналитической химии, химии органического синтеза, а также медицинской и фармацевтической химии, а также относящиеся к ним лабораторные методики и методики, описанные в данном документе, хорошо известны и обычно применяются в данной области техники. Для химического синтеза, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов могут применяться стандартные методики.

[42] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается определенной методологией, протоколами и реагентами и т. д., описанными в данном документе и, таким образом, может изменяться. Терминология, используемая в данном документе, служит только для описания определенных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определен исключительно формулой изобретения.

[43] За исключением рабочих примеров или если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условий реакции, применяемые в данном документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Термин "приблизительно", применяемый по отношению к доле в процентах, может означать $\pm 1\%$.

[44] В соответствии с общепринятыми правилами, как применяется в данном документе, форма единственного числа существительного означает "один или несколько", если конкретно не указано иное.

[45] Используемые в данном документе термины "аминокислота" и "остаток" являются взаимозаменяемыми и, когда применяются в контексте пептида или полипептида, обозначают как встречающиеся в природе, так и синтетические аминокислоты, а также аналоги аминокислот, миметики аминокислот и не встречающиеся в природе аминокислоты, которые химически подобны встречающимся в природе аминокислотам.

[46] "Встречающаяся в природе аминокислота" представляет собой аминокислоту, которая кодируется генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, которые подвергаются модификации после синтеза, например гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аминокислотный аналог представляет собой соединение, которое имеет такую же основную химическую структуру как и встречающаяся в природе аминокислота, например, α -карбон, который присоединен к водороду, карбоксильную группу, амино-группу и R-группу, например, гомосерин, норлейцин, метионина сульфоксид, метионин метил сульфоний. Такие аналоги могут иметь модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные каркасы, но будут сохранять такую же основную химическую структуру как и встречающаяся в природе аминокислота.

[47] "Аминокислотный миметик" представляет собой химическое соединение, которое имеет структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует аналогично встречающейся в природе аминокислоте. Примеры включают метакрилоильное или акрилоильное производное амида, β -, γ -, δ -аминокислоты (такие как пиперидин-4-карбоновая кислота) и т. п.

[48] "Не встречающаяся в природе аминокислота" представляет собой соединение, которое имеет такую же базовую химическую структуру, как и встречающаяся в природе аминокислота, но не включается в растущую полипептидную цепь посредством комплекса трансляции. "Не встречающаяся в природе аминокислота" также включает без

ограничения аминокислоты, которые возникают посредством модификации (например, посредством посттрансляционных модификаций) встречающейся в природе аминокислоты (включая без ограничения 20 стандартных аминокислот), но которые сами по себе в природе не включаются в растущую полипептидную цепь посредством комплекса трансляции. Не ограничивающий список примеров не встречающихся в природе аминокислот, которые могут быть включены в полипептидную последовательность или замещены на остаток дикого типа в полипептидной последовательности, включают в себя: β -аминокислоты, гомоаминокислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты с дериватизированными боковыми цепями. Примеры включают (в L-форме или D-форме; сокращенно, как в скобках) цитруллин (Cit), гомоцитруллин (hCit), $N\alpha$ -метилцитруллин (NMeCit), $N\alpha$ -метилгомоцитруллин ($N\alpha$ -MeHoCit), орнитин (Orn), $N\alpha$ -метилорнитин ($N\alpha$ -MeOrn или NMeOrn), саркозин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hQ), $N\alpha$ -метиларгинин (NMeR), $N\alpha$ -метиллейцин ($N\alpha$ -MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), $N\alpha$ -метилглутамин (NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновую кислоту (Oic), 3-(1-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (Igl), пара-йодфенилаланин (pI-Phe), пара-аминофенилаланин (4AmP или 4-Amino-Phe), 4-гуанидинофенилаланин (Guf), глициллизин (сокращенно "K(N ϵ -глицил)" или "K(глицил)" или "K(gly)"), нитрофенилаланин (nitrophe), аминокислоты (aminophe или амино-Phe), бензилфенилаланин (benzylphe), γ -карбоксиглутаминовую кислоту (γ -carboxyglu), гидроксипролин (hydroxypro), пара-карбоксилфенилаланин (Cpa), α -аминоадипиновую кислоту (Aad), $N\alpha$ -метилвалин (NMeVal), N- α -метиллейцин (NMeLeu), $N\alpha$ -метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклогексилглицин (Chg), ацетиларгинин (acetylarg), α , β -диаминопропионовую кислоту (Dpr), α , γ -диаминомасляную кислоту (Dab), диаминопропионовую кислоту (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метилфенилаланин (MePhe), β , β -дифенилаланин (BiPhA), аминокислоты (Abu), 4-фенилфенилаланин (или бифенилаланин; 4Bip), α -аминоизомасляную кислоту (Aib), бета-аланин, бета-аминопропионовую кислоту, пиперидиновую кислоту, аминокaproновую кислоту, аминокептановую кислоту, аминокимелиновую кислоту, десмозин, диаминокимелиновую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин, аллогидроксизин, изодесмозин, аллоизолейцин, 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-гидроксизин, ω -метиларгинин, 4-амино-о-фталевую кислоту (4APA) и другие подобные аминокислоты и дериватизированные формы любого из конкретно перечисленных.

[49] Термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" относится к одно- или двухнитевому полимеру дезоксирибонуклеотида или рибонуклеотида, основания в котором считываются от 5' к 3'-концу (например, предусмотренная в данном документе

последовательность нуклеиновой кислоты Jagged1) или его аналогу, который был отделен от по меньшей мере 50 процентов полипептидов, пептидов, липидов, углеводов, полинуклеотидов или других материалов, с которыми нуклеиновая кислота обнаруживается в естественных условиях, при выделении всей нуклеиновой кислоты из клеток источника. Предпочтительно, выделенная молекула нуклеиновой кислоты по существу свободна от любых других загрязняющих молекул нуклеиновой кислоты или других молекул, которые обнаруживаются в естественной среде нуклеиновой кислоты, которые мешают ее применению в производстве полипептида или ее терапевтическому, диагностическому, профилактическому или исследовательскому применению.

[50] Термин "выделенный полипептид" относится к полипептиду (например, полипептидная последовательность Jagged1, предусмотренная в данном документе, или антиген-связывающий белок по настоящему изобретению), который был отделен от по меньшей мере 50 процентов полипептидов, пептидов, липидов, углеводов, полинуклеотидов или других материалов, с которыми полипептид обнаруживается в естественных условиях, при выделении из клетки источника. Предпочтительно, выделенный полипептид по существу свободный от любых других загрязняющих полипептидов или других загрязнителей, которые обнаруживаются в его естественной среде, которые мешают его терапевтическому, диагностическому, профилактическому или исследовательскому применению.

[51] Термин "кодирование" относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей одну или несколько аминокислот. Термин не требует наличия старт или стоп кодона.

[52] Термины "идентичный" и процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков аминокислот или нуклеотидов в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основании размера наименьшей из молекул, подлежащих сравнению. В этих расчетах гэпы в выравниваниях (если таковые имеются) могут быть учтены с помощью определенной математической модели или компьютерной программы (т. е. "алгоритма"). Способы, которые могут применяться для расчета идентичности выравниваемых нуклеиновых кислот или полипептидов, включают в себя способы, которые описаны в 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; и Carillo et al., (1988) SIAM J. Applied Math. 48:1073.

[53] При расчете процента идентичности сравниваемые последовательности

выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Компьютерной программой, применяемой для определения процента идентичности, является пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, Университет штата Висконсин, Мэдисон, Висконсин). Компьютерный алгоритм GAP применяют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("диапазон совпадения", который определяется этим алгоритмом). Штраф за открытие гэпа (который рассчитывается как $3 \times$ средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали применяемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, присвоенное каждому полному аминокислотному совпадению в соответствии с определенной матрицей сравнения) и штраф за длину гэпа (который, как правило, составляет 1/10 долю от штрафа за открытие гэпа), а так же матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62, применяют вместе с алгоритмом. В некоторых вариантах осуществления данный алгоритм также использует стандартную матрицу сравнения (см. Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345–352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915–10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62).

[54] Рекомендуемые параметры для определения процента идентичности полипептидов или нуклеотидных последовательностей с применением программы GAP являются следующими:

[55] Алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443–453;

[56] Матрица сравнения: BLOSUM 62 от Henikoff et al., 1992, см. выше;

[57] Штраф за гэп: 12 (но без штрафа за концевые гэпы)

[58] Штраф за длину гэпа: 4

[59] Пороговое значение степени сходства: 0

[60] В результате применения некоторых схем выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей можно получить совпадение только на коротком участке данных двух последовательностей, и данный небольшой выровненный участок может обладать очень высокой идентичностью последовательности даже при отсутствии значительной взаимосвязи между данными двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, выбранный способ выравнивания (программа GAP) может быть при желании адаптирован для обеспечения выравнивания, которое охватывает по меньшей мере 50 смежных аминокислот полипептида–мишени.

[61] Термины "полипептид Jagged1" и "белок Jagged1" применяют взаимозаменяемо, и они обозначают встречающийся в природе полипептид дикого типа, экспрессирующийся у млекопитающего, такого как человек или мышь, и включают встречающиеся в природе аллели (например, встречающиеся в природе аллельные формы белка Jagged1 человека). Для целей настоящего изобретения термин "полипептид Jagged1"

может использоваться взаимозаменяемо для обозначения любого полноразмерного полипептида Jagged1, например SEQ ID NO: 353, которая состоит из 1218 аминокислотных остатков и которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 354.

[62] Термин "полипептид Jagged1" также включает полипептид Jagged1, в котором встречающаяся в природе полипептидная последовательность Jagged1 (например, SEQ ID NO: 353) была модифицирована. Такие модификации включают без ограничения одну или несколько аминокислотных замен, включая замены на не встречающиеся в природе аминокислоты, не встречающиеся в природе аналоги аминокислот и миметики аминокислот.

[63] В различных вариантах осуществления полипептид Jagged1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 85 процентов идентична встречающемуся в природе полипептиду Jagged1 (например, SEQ ID NO: 353). В других вариантах осуществления полипептид Jagged1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90 процентов или приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентична встречающейся в природе аминокислотной последовательности полипептида Jagged1 (например, SEQ ID NO: 353). Такие полипептиды Jagged1 предпочтительно, но не обязательно, обладают по меньшей мере одной активностью полипептида Jagged1 дикого типа, такой как способность связывать рецептор Notch. Настоящее изобретение также охватывает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие полипептидные последовательности Jagged1.

[64] Термины "анализ активности Jagged1" (также называемый "функциональным анализом Jagged1") означает анализ, который может использоваться для измерения активности Jagged1 или рецептора Jagged1 (т. е. Notch 1–4) в клеточном окружении.

[65] Термин "анализ связывания Jagged1" означает анализ, который может использоваться для измерения связывания Jagged1 с Notch1–4. В одном варианте осуществления "анализ связывания Jagged1" может являться анализом с применением FMAT или FACS, который измеряет связывание флуоресцентно–меченного Jagged1 с экспрессирующими Notch 1–4 клетками, а активность связывающего белка Jagged1/Notch 1–4 может быть измерена по вытеснению флуоресцентно–меченного Jagged1, связывающегося с клетками, экспрессирующими Notch 1–4. В другом варианте осуществления "анализ связывания Jagged1" может являться анализом, который измеряет связывание радиоактивно–меченного Jagged1 с экспрессирующими Notch 1–4 клетками, а активность связывающего белка Jagged1/Notch 1–4 может быть измерена по вытеснению радиоактивно–меченного Jagged1, связывающегося с клетками, экспрессирующими Notch 1–4 (Biochimica et Biophysica Acta (2001) 1547:143–155).

[66] Термин "антиген–связывающий белок", как применяется в данном документе, означает любой белок, который специфически связывает определенный антиген–мишень, такой как полипептид Jagged1 (например, полипептид Jagged1 человека, такой как

представленный под SEQ ID NO: 353). Также термин охватывает интактные антитела, которые содержат по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, а также их производные, варианты, фрагменты и мутации. Примеры фрагментов антител включают в себя фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv. Антиген–связывающий белок также включает в себя доменные антитела, такие как нанотела и scFv как дополнительно описано ниже.

[67] В целом, антиген–связывающий белок, взаимодействующий с Jagged1, "специфически связывает" свой антиген–мишень Jagged1, в то время как антиген–связывающий белок проявляет по сути фоновое связывание с молекулами, отличными от Jagged1. Антиген–связывающий белок, который специфически связывает Jagged1, может однако вступать в перекрестную реакцию с полипептидами Jagged1 из различных видов. Как правило, антиген–связывающий белок, взаимодействующий с Jagged1, специфически связывает Jagged1 человека, если константа диссоциации (KD) составляет $\leq 10^{-7}$ М, как измерено с помощью методики поверхностного плазмонного резонанса (например, BIAcore, GE–Healthcare, Упсала, Швеция) или анализа кинетического исключения (KinExA, Sapidyne, Бойсе, Айдахо). Антиген–связывающий белок, взаимодействующий с Jagged1, специфически связывает Jagged1 человека с "высокой аффинностью", если KD составляет $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, и с "очень высокой аффинностью", если KD составляет $\leq 5 \times 10^{-10}$ М, как измерено с применением описанных способов.

[68] "Антиген–связывающая область" означает белок или часть белка, которые специфически связывают определенный антиген. Например, та часть антиген–связывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и обеспечивают для антиген–связывающего белка его специфичность и аффинность к антигену, называется "антиген–связывающая область." Антиген–связывающая область, как правило, включает одну или несколько "комплементарных связывающих областей" ("CDR") иммуноглобулина, одноцепочечного иммуноглобулина или верблюжьего антитела. Некоторые антиген–связывающие области также включают одну или несколько "каркасных" областей. "CDR" представляет собой аминокислотную последовательность, которая способствует антиген–связывающей специфичности и аффинности. "Каркасные" области могут способствовать поддержанию надлежащей конформации CDR для содействия связыванию между антиген–связывающей областью и антигеном.

[69] "Рекомбинантный белок", включающий рекомбинантный белок, связывающий антиген Jagged1, представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методик, т. е. посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. Способы и методики получения рекомбинантных белков хорошо известны из уровня техники.

[70] Термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или его фрагменту, который может конкурировать с интактным антителом за специфическое связывание с антигеном–мишенью и включает, например, химерные,

гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. "Антитело" как таковое представляет собой вид антиген–связывающего белка. Интактное антитело, как правило, будет содержать по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи. Антитела могут быть получены исключительно из одного источника или могут быть "химерными", то есть различные части антитела могут быть получены из двух различных антител, как дополнительно описано ниже. Антиген–связывающие белки, антитела, или связывающие фрагменты могут быть получены в гибридомах с помощью методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител.

[71] Термин "легкая цепь", как применяется по отношению к антителу или его фрагментам, включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает в себя домен вариабельной области, VL, и домен константной области, CL. Домен вариабельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкие цепи включают каппа–цепи и лямбда–цепи.

[72] Термин "тяжелая цепь", как применяется по отношению к антителу или его фрагменту, включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает в себя домен вариабельной области, VH, и три домена константной области, CH1, CH2 и CH3. Домен VH расположен на аминоконце полипептида, а домены CH расположены на карбоксильном конце, причем ближе всех к карбоксильному концу полипептида расположен CH3. Тяжелые цепи могут быть любого изотипа, в том числе IgG (в том числе подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (в том числе подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

[73] Термин "иммунологически функциональный фрагмент" (или просто "фрагмент") антитела или цепи иммуноглобулина (тяжелой или легкой цепи), применяемый в данном документе, представляет собой антиген–связывающий белок, содержащий часть (вне зависимости от того, как эта часть была получена или синтезирована) антитела, в которой отсутствуют по меньшей мере некоторые аминокислоты, присутствующие в полноразмерной цепи, но которая способна специфически связываться с антигеном. Такие фрагменты являются биологически активными, так как они специфически связываются с антигеном–мишенью и могут конкурировать с другими антиген–связывающими белками, включая интактные антитела, за специфическое связывание с заданным эпитопом.

[74] Эти биологически активные фрагменты могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК или могут быть получены, например, посредством ферментативного или химического расщепления антиген–связывающих белков, включая интактные антитела. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулинов включают без ограничения фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂.

[75] В другом варианте осуществления Fvs, доменные антитела и scFvs могут быть получены из антитела по настоящему изобретению.

[76] Дополнительно, предполагается, что функциональная часть антиген-связывающих белков, раскрытых в данном документе, например, одна или несколько CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или с малой молекулой с целью создания терапевтического средства, направленного на определенную мишень в организме, обладающего бифункциональными терапевтическими свойствами или имеющего пролонгированный период полужизни в сыворотке крови.

[77] "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи и CH1 и вариабельных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

[78] Область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащих домены CH2 и CH3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или большим количеством дисульфидных связей, и посредством гидрофобных взаимодействий доменов CH3.

[79] "Фрагмент Fab'" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен VH и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с получением молекулы F(ab')₂.

[80] "Фрагмент F(ab')₂" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

[81] "Область Fv" содержит вариабельные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не имеет константных областей.

[82] "Одноцепочечные антитела" или "scFv" представляют собой молекулы Fv, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей соединены с помощью гибкого линкера с образованием единой полипептидной цепи, в результате чего образуется антиген-связывающая область. scFv подробно рассмотрены в международной публикации патентной заявки № WO 88/01649 и в патентах США № 4946778 и № 5260203, раскрытие которых включено посредством ссылки.

[83] "Доменное антитело" или "одноцепочечный иммуноглобулин" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. Примеры доменных антител включают в себя Nanobodies®. В некоторых случаях две или более областей VH соединены ковалентной связью с помощью пептидного линкера с целью создания бивалентного доменного антитела. Мишенями для таких двух областей VH бивалентного доменного антитела могут служить одинаковые или различные антигены.

[84] "Бивалентный антиген–связывающий белок" или "бивалентное антитело" содержат две антиген–связывающие области. В некоторых случаях две связывающие области имеют одинаковые антигенные специфичности. Бивалентные антиген–связывающие белки или двухвалентные антитела могут быть биспецифическими (см. ниже).

[85] "Мультиспецифический антиген–связывающий белок" или "мультиспецифическое антитело" представляют собой белок или антитело, мишенью для которых является больше чем один антиген или эпитоп.

[86] "Биспецифический", "с двойной специфичностью" или "бифункциональный" антиген–связывающий белок или антитело представляют собой гибридный антиген–связывающий белок или антитело соответственно, имеющие два различных антиген–связывающих участка. Биспецифические антиген–связывающие белки и антитела представляют собой вид мультиспецифического антиген–связывающего белка или мультиспецифического антитела и могут быть получены с помощью ряда способов, в том числе, не ограничиваясь лишь этими: слиянием гибридом или соединением фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315–321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547–1553. Два связывающих участка биспецифического антиген–связывающего белка или антитела будут связывать два различных эпитопа, которые могут располагаться на одних и тех же или различных белках–мишенях.

[87] Термин "конкурировать", если применяется в контексте антиген–связывающих белков (например, антител), означает конкуренцию между антиген–связывающими белками, которая определяется с помощью анализа, в котором исследуемый антиген–связывающий белок (например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент) предотвращает или подавляет специфическое связывание эталонного антиген–связывающего белка с общим антигеном (например, Jagged1 или его фрагментом). Можно применять многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич–анализ (см., например, Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242–253); твердофазный прямой EIA с биотин–авидином (см., например, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614–3619), твердофазный анализ с применением прямого мечения, твердофазный сэндвич–анализ с применением прямого мечения (см., например, Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с применением прямого мечения с использованием в качестве метки I–125 (см., например, Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7–15); твердофазный прямой EIA с биотин–авидином (см., например, Cheung, et al., 1990, Virology 176:546–552) и RIA с применением прямого мечения (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77–82). Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из следующих: немеченого исследуемого

антиген–связывающего белка и меченого эталонного антиген–связывающего белка. Конкурентное ингибирование измеряют, определяя количество метки, связанной с твердой поверхностью, или клеток в присутствии исследуемого антиген–связывающего белка. Обычно исследуемый антиген–связывающий белок присутствует в избытке. Дополнительные подробности относительно способов определения конкурентного связывания предоставлены в примерах в данном документе. Обычно, если конкурирующий антиген–связывающий белок присутствует в избытке, он будет подавлять специфическое связывание эталонного антиген–связывающего белка с общим антигеном на по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%.. В некоторых случаях связывание подавляется на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 97% или больше.

[88] Термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, которых способно связывать селективное связывающее средство, такое как антиген–связывающий белок (включая, например, антитело), и которых дополнительно можно применять для выработки в организме животного антител, способных к связыванию с данным антигеном. Антиген может содержать один или несколько эпитопов, которые способны взаимодействовать с различными антиген–связывающими белками, например, антителами.

[89] Термин "эпитоп" относится к части молекулы, которая связывается антиген–связывающим белком (например, антителом). Термин включает в себя любую детерминанту, способную специфически связываться с антиген–связывающим белком, таким как антитело. Эпитоп может быть смежным или несмежным (прерывистым) (например, это аминокислотные остатки в полипептиде, которые не являются смежными по отношению друг к другу в полипептидной последовательности, но в пределах молекулы связываются антиген–связывающим белком). Конформационный эпитоп представляет собой эпитоп, который существует в конформации активного белка, но не присутствует в денатурированном белке. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут являться миметиками в том смысле, что они имеют трехмерную структуру, аналогичную эпитопу, применяемому для получения антиген–связывающего белка, но при этом не содержат или содержат только некоторые аминокислотные остатки, обнаруживаемые в том эпитопе, который применяли для получения антиген–связывающего белка. Наиболее часто эпитопы находятся на белках, но в некоторых случаях могут находиться на других видах молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Эпитопные детерминанты могут включать в себя химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут обладать конкретными трехмерными структурными характеристиками и/или конкретными характеристиками заряда. В целом, как правило, антиген–связывающие белки, специфические в отношении конкретного антигена–мишени, предпочтительно распознают эпитоп на антигене–мишени в сложной смеси из белков и/или макромолекул.

[90] Применяемое в данном документе выражение "практически чистый" означает, что описываемый вид молекулы присутствует в качестве преобладающего вида, то есть по молярному содержанию он является более многочисленным по сравнению с любым другим отдельным видом в той же смеси. В определенных вариантах осуществления практически чистая молекула представляет собой композицию, в которой целевые частицы составляют по меньшей мере 50% (в молярном отношении) от всех присутствующих макромолекулярных частиц. В других вариантах осуществления практически чистая композиция будет содержать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% всех макромолекулярных частиц, присутствующих в композиции. В других вариантах осуществления целевую частицу очищают до существенной степени гомогенности, где загрязняющие частицы не могут быть обнаружены в композиции обычными способами обнаружения, и, таким образом, композиция состоит из одной обнаруживаемой макромолекулярной частицы.

[91] Термин "лечение" относится к любому признаку успеха в лечении или уменьшении интенсивности повреждения, патологии или состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление боли или выраженности симптома; ремиссия; ослабление симптомов или способствование лучшей переносимости повреждения, патологии или состояния у пациента; замедление темпов дегенерации или ухудшения; способствование менее тяжелому протеканию конечной стадии дегенерации; улучшение физического или психического здоровья пациента. Лечение или облегчение симптомов может быть основано на объективных или субъективных параметрах; в том числе по результатам медицинского обследования, психоневрологических осмотров и/или психиатрической экспертизы.

[92] "Эффективное количество", как правило, представляет собой количество, достаточное для уменьшения выраженности и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или основной причины, предотвращения возникновения симптомов и/или их основной причины, и/или улучшения или устранения поражения, которое является результатом или связано с патологическим состоянием (например, заболеванием легкого). В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. "Терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для ослабления интенсивности патологического состояния или симптомов, в частности, состояния или симптомов, связанных с патологическим состоянием, или иного предотвращения, препятствования, замедления или обращения вспять прогрессирования патологического состояния или любого другого нежелательного симптома, связанного с заболеванием в какой бы то ни было форме. "Профилактически эффективное количество" представляет собой количество фармацевтической композиции, которое при введении субъекту будет оказывать предполагаемый профилактический эффект, например предотвращение или задерживание возникновения (или повторения) патологического состояния, или снижение вероятности возникновения (или повторения) патологического

состояния или связанных с ним симптомов. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникает в результате введения одной дозы, и может возникнуть только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество может быть введено одним или большим количеством введений.

[93] Термины "терапевтически эффективная доза" и "терапевтически эффективное количество", применяемые в данном документе, обозначают количество белка, связывающего антиген Jagged1, которое вызывает биологический или лекарственный ответ в тканевой системе, организме животного или человека, предусмотренный исследователем, врачом или другим клиницистом, который включает облегчение или улучшение в отношении симптомов заболевания или нарушения, лечение которых осуществляют, т. е. количество белка, связывающего антиген Jagged1, за счет которого поддерживается наблюдаемый уровень одного или нескольких желаемых биологических или лекарственных ответов, например, снижение уровня запасенного муцина и/или снижение числа бокаловидных клеток на объем эпителия.

[94] Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как одонитевые, так и двухнитевые нуклеотидные полимеры. Нуклеотиды, входящие в состав полинуклеотида, могут быть рибонуклеотидами или дезоксирибонуклеотидами, или модифицированной формой любого из этих типов нуклеотидов. Модификации включают модификации оснований, такие как бромуридиновые и инозиновые производные, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфоранилинотиоат, фосфораниладат и фосфорамидат.

[95] Термин "олигонуклеотид" означает полинуклеотид, содержащий 200 или меньше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 10 до 60 оснований. В других вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 до 40 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одонитевыми или двухнитевыми, например, для применения в конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут быть смысловыми или бессмысловыми олигонуклеотидами. Олигонуклеотид может содержать метку, включая радиометку, флуоресцентную метку, гаптенную или антигенную метку для применения в анализах обнаружения. Олигонуклеотиды можно применять, например, в качестве праймеров для ПЦР, клонирующих праймеров или гибридизационных зондов.

[96] "Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает геномную ДНК или РНК, мРНК, кДНК или молекулу синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, которые не связаны со всем или частью полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид обнаруживается в природе, или связаны с полинуклеотидом, с которым они не связаны в природе. Применительно к настоящему изобретению, следует понимать, что "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную

последовательность, не охватывает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" указанные нуклеотидные последовательности, могут содержать, вдобавок к указанным последовательностям, кодирующие последовательности для не более десяти или даже не более двадцати других белков или их частей, или могут содержать функционально связанные регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией кодирующей области указанных нуклеотидных последовательностей, и/или могут содержать векторные последовательности.

[97] Если не указано иное, левый конец любой обсуждаемой в данном документе однострочной полинуклеотидной последовательности является 5'-концом; левое направление двухнитевых полинуклеотидных последовательностей называется 5'-направлением. Направление от 5' к 3', в котором происходит наращивание возникающих РНК-транскриптов, называется направлением транскрипции; области последовательности цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, что и РНК-транскрипт, которые расположены в направлении 5' по отношению к 5'-концу РНК-транскрипта, называются "вышележащими последовательностями"; участки последовательности нити ДНК, имеющие такую же последовательность, что и РНК-транскрипт, которые расположены в направлении 3' по отношению к 3'-концу РНК-транскрипта, называются "нижележащими последовательностями".

[98] Термин "регуляторная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, которая может влиять на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым она лигирована. Природа таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах осуществления регуляторные последовательности для прокариот могут включать промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. Например, регуляторные последовательности для эукариот могут включать в себя промоторы, содержащие один или множество сайтов распознавания транскрипционных факторов, транскрипционные энхансерные последовательности и последовательности терминации транскрипции. "Регуляторные последовательности" могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнеров по слиянию.

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

[100] Термин "экспрессионный вектор" или "экспрессионная конструкция" относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит нуклеотидные последовательности, которые управляют и/или регулируют (вместе с клеткой-хозяином) экспрессию одной или нескольких гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ними. Экспрессионная конструкция может включать в себя, но не ограничивается лишь этими: последовательности, которые влияют на или регулируют транскрипцию, трансляцию и, в случае наличия интронов, влияют на

РНК–сплайсинг кодирующей области, функционально связанной с ними.

[101] Применяемый в данном документе, "функционально связанный" означает, что компоненты, к которым относится данный термин, находятся в связи, которая позволяет выполнять присущие им функции в подходящих условиях. Например, регуляторная последовательность в векторе, которая "функционально связана" с кодирующей белок последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей белок последовательности достигается в условиях, совместимых с транскрипционной активностью регуляторных последовательностей.

[102] Термин "клетка–хозяин" означает клетку, которая была трансформирована с помощью нуклеотидной последовательности и, таким образом, экспрессирует представляющий интерес ген. Данный термин включает в себя потомство исходной клетки вне зависимости от того, идентично или нет это потомство по морфологии или по генетической конструкции исходной родительской клеткой, до тех пор, пока присутствует представляющий интерес ген.

[103] Термины "полипептид" или "белок" применяют взаимозаменяемо в данном документе для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Также данные термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков является аналогом или миметиком соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам. Термины также могут охватывать аминокислотные полимеры, которые были модифицированы, например, путем добавления углеводных остатков для формирования гликопротеинов, или фосфорилированы. Полипептиды и белки могут быть получены с помощью нерекомбинантной встречающейся в природе клетки, или с помощью генетически сконструированной или рекомбинантной клетки, и могут содержать молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, содержащие делеции, дополнения и/или замены одной или нескольких аминокислот нативной последовательности. Термины "полипептид" и "белок", в частности, охватывают белки, связывающие антиген Jagged1, антитела или последовательности, которые содержат делеции, добавления и/или замещения одной или нескольких аминокислот антиген–связывающего белка. Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который имеет амино–концевую делецию, карбокси–концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В определенных вариантах осуществления длина фрагментов составляет приблизительно от пяти до 500 аминокислот. Например, длина фрагментов может составлять по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Пригодные фрагменты полипептидов включают в себя иммунологически функциональные фрагменты антител, включая связывающие домены.

[104] Термин "выделенный белок" означает, что указанный белок (1) не содержит по меньшей мере некоторых других белков, с которыми он обычно встречается, (2)

практически не содержит других белков из того же источника, например, полученных из того же вида, (3) экспрессируется клеткой, полученной от другого вида, (4) был отделен по меньшей мере от приблизительно 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которым он связан 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. Как правило "выделенный белок" составляет по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 25% или по меньшей мере приблизительно 50% данного образца. Такой выделенный белок может кодировать геномная ДНК, кДНК, мРНК или другая РНК синтетического происхождения, или любая их комбинация. Предпочтительно выделенный белок, по существу, не содержит белков или полипептидов или других загрязняющих веществ, которые обнаружены в его естественной среде, способных помешать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению.

[105] "Вариант" полипептида (например, антиген–связывающий белок, такой как антитело) содержит аминокислотную последовательность, где один или несколько аминокислотных остатков вставлено в, удалено из и/или замещено в данной аминокислотной последовательности по сравнению с другой полипептидной последовательностью. Варианты включают в себя гибридные белки.

[106] "Производное" полипептида представляет собой полипептид (например, антиген–связывающий белок, такой как антитело), который был химически модифицирован некоторым образом, отличным от инсерционных, делеционных или замещенных вариантов, например, путем конъюгации с другим химическим фрагментом.

[107] Как применяется повсюду в тексте настоящего описания, в отношении биологических материалов, таких как полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки–хозяева и тому подобное, термин "встречающийся в природе" относится к материалам, которые можно обнаружить в природе.

[108] "Субъект" или "пациент", как применяется в данном документе, могут быть любым млекопитающим. В типичном варианте осуществления субъект или пациент являются человеком.

[109] Как раскрыто в данном документе, полипептид Jagged1, описанный в настоящем раскрытии, может быть сконструирован и/или получен с применением стандартной методологии молекулярной биологии. В различных примерах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Jagged1, которая может содержать всю или часть SEQ ID NO: 353, может быть выделена и/или амплифицирована из геномной ДНК или кДНК с применением подходящих олигонуклеотидных праймеров. Праймеры могут быть сконструированы на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, предусмотренных в данном документе, в соответствии со стандартными методиками (RT)–PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Амплифицированная нуклеиновая кислота Jagged1 может быть затем

клонирована в подходящий вектор и охарактеризована с помощью анализа последовательности ДНК.

[110] Олигонуклеотиды для применения в качестве зондов для выделения или амплификации всей или части последовательностей Jagged1, предусмотренных в данном документе, могут быть сконструированы и получены с применением стандартных синтетических методик, например, посредством устройства для автоматизированного синтеза ДНК или могут быть выделены из более длинной последовательности ДНК.

[111] 1218 аминокислотная последовательность Jagged1 человека представляет собой

MRSRTRGRS	GRPLSLLLAL	LCALRAKVCG	ASGQFELEIL	SMQNVNGELQ
NGNCCGGARN				
PGDRKCTRDE	CDTYFKVCLK	EYQSRVTAGG	PCSFSGGSTP	VIGGNTFNLK
ASRGNDRNRI				
VLPFSAWPR	SYTLLVEAWD	SSNDTVQPDS	IIEKASHSGM	INPSRQWQTL
KQNTGVAHFE				
YQIRVTCDDY	YYGFGCNKFC	RPRDDFFGHY	ACDQNGNKTC	MEGWMGRECN
RAICRQGCSP				
KHGSKLPGD	CRCQYGWQGL	YCDKCIPHPG	CVHGICNEPW	QCLCETNWGG
QLCDKDLNYC				
GTHQPCLNGG	TCSNTGPDKY	QCSCPEGYSG	PNCEIAEHAC	LSDPCHNRGS
CKETSLGFEC				
ECSPGWTGPT	CSTNIDDCSP	NNCSHGGTCQ	DLVNGFKCVC	PPQWTGKTCQ
LDANECEAKP				
CVNAKSCKNL	IASYYCDCLP	GWMGQNCIN	INDCLGQCQN	DASCRDLVNG
YRCICPPGYA				
GDHCERDIDE	CASNPCLDGG	HCQNEINRFQ	CLCPTGFSGN	LCQLDIDYCE
PNPCQNGAQC				
YNRASDYFCK	CPEDYEGKNC	SHLKDHCRTT	PCEVIDSCTV	AMASNDTPEG
VRYISSNVC				
PHGKCKSQSG	GKFTCDCNKG	FTGTYCHENI	NDCESNPCRN	GGTCIDGVNS
YKCICSDGWE				
GAYCETNIND	CSQNPCHNGG	TCRDLVNDFY	CDCKNGWKGK	TCHSRDSQCD
EATCNNGGTC				
YDEGDAFKCM	CPGGWEGTTC	NIARNSSCLP	NPCHNGGTCV	VNGESFTCVC
KEGWEGPICA				
QNTNDCSPHP	CYNSGTCVDG	DNWYRCECAP	GFAGPDCRIN	INECQSSPCA
FGATCVDEIN				
GYRCVCPPGH	SGAKCQEVSG	RPCITMGSVI	PDGAKWDDDC	NTCQCLNGRI
ACSKVWCGPR				
PCLLHKGHSE	CPSGQSCIPI	LDDQCFVHPC	TGVGECRSSS	LQPVKTKCTS

DSYYQDNCAN

ITFTFNKEMM SPGLTTEHIC SELRNLNILK NVSAEYSIYI ACEPSPSANN EIHVAISAED
IRDDGNPIKE ITDKIIDLVS KRDGNSSLIA AVAEVRVQRR PLKNRTDFLV
PLLSSVLTV

WICCLVTAFY WCLRKRKPG SHTHSASEDN TTNNVREQLN QIKNPIEKHG
ANTVPIKDYE

NKNSKMSKIR THNSEVEEDD MDKHQQKARF AKQPAYTLVD REEKPPNGTP
TKHPNWTNKQ

DNRDLESAQS LNRMEYIV

[112] (SEQ ID NO: 353)

[113] и кодируется последовательностью ДНК:

[114]

atgcgttccccacggacgcgcggccgggtccgggcggccctaaagcctcctgctgcctgctctgtgccctgcgagccaaggtgtgtggg
gcctcggggtcagttcgagttggagatcctgtccatgcagaacgtgaacggggagctgcagaacgggaactgctgcggcgccggga
acccgggagaccgcaagtgcacccgcgacgagtgtagacacatacttcaagtgctcctcaaggagtagcagtcgccgcgcggggg
gggcctgcagcttcggctcagggtccacgcctgtcatcgggggcaacacctcaacctcaaggccagccgcggcaacgaccgcaacc
gcatcgtgctgcctttcagtttcgctggcggaggtcctatacgttgcctgtggaggcgtgggattccagtaacgacacgttcaacctgacag
tattattgaaaaggcttctcactcgggcatgatcaacccagccggcagtggtgagacgctgaagcagaacacgggcttgcctactttgag
tatcagatccgctgacctgtgatgactactactatggctttggctgcaataagttctgccgccccagagatgacttcttggacactatgctg
tgaccagaatggcaaaaaacttgcattggaaggctggatgggcccgaatgtaacagagctatttgcgacaaggctgcagtcctaagca
tgggtcttgcacactccaggtgactgcagtgccagtagggctggcaaggcctgtactgtgataagtgatccacacccgggatgctgc
cacggcatctgtaatgagccctggcagtgctctgtgagaccaactggggcgccagctctgtgacaaagatctcaattactgtgggactca
tcagccgtgtctcaacgggggaactttagcaacacaggccctgacaaatatcagtggttctgcctgaggggtattcaggacccaactgtg
aaattgctgagcacgctgcctctctgatccctgtcacaacagaggcagctgtaaggagacctccctgggctttgagtgtagtggttccca
ggctggaccggccccacatgctctacaaacattgatgactgttctcctaataactgttccacgggggcacctgccaggacctggftaacgg
atttaagtgtgtgtgccccacagtggtgactgggaaaacgtgccagttagatgcaaatgaatgtgaggccaaacctgtgtaaacgcaaat
cctgtaagaatctcattgccagctactactgcgactgtcttccggctggatgggtcagaattgtgacataaatattaatgactgccttggccag
tgtcagaatgacgcctcctgtcgggatttggftaatggttatcgtgtatctgtccacctggctatgcaggcagcactgtgagagagacatcg
atgaatgtgccagcaacccctgtttggatgggggtcactgtcagaatgaaatcaacagattccagtgctgtgtcccactgtttctctgaaa
cctctgtcagctggacatcgattattgtgagcctaaccctgccagaacgggtgccagtgctacaacctgccagtgactatttctgcaagtgc
cccaggagactatgagggaagaactgtcacacctgaaagaccactgccgcacgacccctgtgaagtattgacagctgcacagtggc
catggcttccaacgacacacctgaaggggtgcggtatatttctccaacgtctgtgtctcacgggaagtgaagagtcagtcgggagggc
aaattcacctgtgactgtaacaaaggcttcacgggaacatactgcatgaaaataattaatgactgtgagagcaacccctgtgaaacgggtggc
actgcatcgatgggtgtaactcctacaagtgcactctgtagtacggctgggagggggcctactgtgaaaccaatattaatgactgcagcca
gaacccctgccacaatgggggcacgtgtcgcgacctggtaactgacttctactgtgactgtaaaaatgggtggaaaggaaagacctgcca
ctcacgtgacagtcagtgatgagggccacgtgcaacaacgggtggcacctgctatgatgagggggatgcttttaagtgcattgtcctggcg
gctgggaagggaacaacctgtaacatagcccgaacagtagctgcctgcccacccctgccataatgggggcacatgtgtgtgtaacggc
gagtcctttacgtgcgtctgcaaggaaggctgggagggggccatctgtgtcagaataccaatgactgcagccctcatccctgttacaacag
cggcacctgtgtgatggagacaactgtaccgggtgcgaatgtccccgggttttctgtggcccgactgcagaataaacatcaatgaatgc
cagtcctcacctgtgcctttggagcgacctgtgtggatgagatcaatggctaccgggtgtgtctgcctccagggcacagtggtgccaagtgc

caggaagtttcaggagacctgcatcaccatggggagtgatgataccagatggggccaaatgggatgatgactgtaatacctgccagtgcc
tgaatggacggatcgctgctcaaaggtctggtgtggccctcgacctgctccacaaagggcacagcgagtccccagcgggcag
agctgcatccccatcctggacgaccagtgtctgcccacctgactgggtgtgggcgagtgctgggtcttccagtctccagccggtgaagac
aaagtgcacctctgactcctattaccaggataactgtgcgaacatcacatttaccttaacaaggagatgatgtcaccaggtcttactacggag
cacatttgcagtgaattgaggaattgaatatttgaagaatgttccgctgaatattcaatctacatcgcttgcgagccttccccctcagcgaaca
atgaaatacatgtggccatttctgctgaagatafacgggatgatgggaacccgatcaaggaaatcactgacaaaataattgatcttgttagtaa
acgtgatggaacacgctcgctgattgctgccgttgcagaagtaagagttcagaggcggcctctgaagaacagaacagatttccttgttcctt
gctgagctctgtcttaactgtggcttggatctgttgccttggtgacggccttctactggtgcctgcggaagcggcggaagccgggcagccaca
cacactcagcctctgaggacaacaccaccaacaacgtgcgggagcagctgaaccagatcaaaaacccattgagaaacatggggccaa
cacgggtcccatcaaggattacgagaacaagaactccaaaatgtctaaaataaggacacacaattctgaagtagaaggagcagcatgga
caaacaccagcagaaaagcccggttgcgaagcagccggcgatatacgtggttagacagagaagagagagcccccaacggcacgccgac
aaaacacccaaactggacaaacaacaggacaacagagacttggaagtgccagagcttaaacggaatggagtacatcgatatag
(SEQ ID NO: 354).

[115] Как указано в данном документе, термин "полипептид Jagged1" охватывает встречающиеся в природе полипептидные последовательности Jagged1, например аминокислотные последовательности человека SEQ ID NO: 353. Однако термин "полипептид Jagged1" также охватывает полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности встречающейся в природе полипептидной последовательности Jagged1 одной или несколькими аминокислотами, так что последовательность на по меньшей мере 85% идентична SEQ ID NO: 353. Полипептиды Jagged1 могут быть получены путем введения одной или нескольких аминокислотных замен, либо консервативных, либо неконсервативных, и применяя встречающиеся или не встречающиеся в природе аминокислоты, в определенные положения полипептида Jagged1.

[116] "Консервативная аминокислотная замена" может включать замену нативного аминокислотного остатка (т. е. остатка, обнаруженного в данном положении полипептидной последовательности Jagged1 дикого типа) на ненативный остаток (т. е. остаток, который не обнаруживается в данном положении полипептидной последовательности Jagged1 дикого типа), так что она влияет мало или вообще не влияет на полярность или заряд аминокислотного остатка в данном положении. Консервативные аминокислотные замены также охватывают не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые, как правило, внесены посредством химического пептидного синтеза, а не синтеза в биологических системах. Они включают в себя пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных компонентов.

[117] Встречающиеся в природе остатки можно разделить на классы, исходя из общих свойств боковой цепи:

[118] (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[119] (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr;

[120] (3) кислотные: Asp, Glu;

[121] (4) основные: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

[122] (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и

[123] (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[124] Дополнительные группы аминокислот также могут быть составлены с применением принципов, описанных, например, в Creighton (1984) *PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES* (2d Ed. 1993), W.H. Freeman and Company. В некоторых случаях может быть полезно дополнительно охарактеризовать замены на основе двух или более таких признаков (например, замена на "малый полярный" остаток, такой как остаток Thr, может представлять собой весьма консервативную замену в соответствующем контексте).

[125] Консервативные замены могут включать замену члена одного из данных классов на другой член того же класса. Неконсервативные замены могут включать замену члена одного из данных классов членом другого класса.

[126] Синтетические, редкие или модифицированные аминокислотные остатки, имеющие известные физико-химические свойства, сходные со свойствами аминокислот описанных выше классов, могут быть использованы в качестве "консервативного" заместителя для конкретного аминокислотного остатка в последовательности. Например, остаток D-Arg может служить заменой типичного остатка L-Arg. Также может быть случай, когда конкретная замена может быть описана в отношении двух или более описанных выше классов (например, замена малым и гидрофобным остатком означает замену одной аминокислоты остатком(-ами), который входит в оба из вышеописанных классов, или другими синтетическими, редкими или модифицированными остатками, которые известны из уровня техники как имеющие сходные физико-химические свойства с теми остатками, которые соответствуют обоим определениям).

[127] Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид Jagged1, предусмотренный в данном документе, включая те, которые вырождены до SEQ ID NO: 354, и те, которые кодируют варианты полипептидов под SEQ ID NO: 353, образуют другие аспекты настоящего изобретения.

[128] Чтобы экспрессировать последовательности нуклеиновых кислот Jagged1, предусмотренные в данном документе, подходящие кодирующие последовательности, например SEQ ID NO: 354, могут быть клонированы в подходящий вектор и после введения подходящему хозяину последовательность может быть экспрессирована для продуцирования кодируемого полипептида в соответствии со стандартными методиками клонирования и экспрессии, которые известны из уровня техники (например, как описано в Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Настоящее изобретение также относится к таким векторам, которые содержат нуклеотидную последовательность согласно настоящему изобретению.

[129] "Вектор" относится к среде-носителю для доставки, которая (a) способствует экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид; (b) способствует получению полипептида из нее; (c) способствует

трансфекции/преобразованию клеток–мишеней с их помощью; (d) способствует репликации последовательности нуклеиновой кислоты; (e) способствует стабильности нуклеиновой кислоты; (f) способствует обнаружению нуклеиновой кислоты и/или трансформированных/трансфицированных клеток; и/или (g) иным образом обеспечивает преимущественные биологическую и/или физиохимическую функции нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. Вектор может быть любым подходящим вектором, включая хромосомные, нехромосомные и синтетические нуклеотидные векторы (нуклеотидная последовательность, содержащая подходящий набор элементов управления экспрессией). Примеры таких векторов включают в себя: производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и нуклеотидные (РНК или ДНК) вирусные векторы.

[130] Рекомбинантные экспрессионные векторы могут быть сконструированы для экспрессии белка Jagged1 в прокариотических (например, *E. coli*) или эукариотических клетках (например, клетки насекомых с применением бакуловирусных экспрессионных векторов, дрожжевых клеток или клеток млекопитающих). В одном варианте осуществления клетка–хозяин представляет собой клетку–хозяина млекопитающего, отличную от человеческой. Иллюстративные клетки–хозяева включают тех хозяев, которые обычно применяют для клонирования и экспрессии, включая штаммы *Escherichia coli* TOP10F', TOP10, DH10B, DH5a, HB101, W3110, BL21(DE3) и BL21 (DE3)pLysS, BLUESCRIPT (Stratagene), линии клеток млекопитающих CHO, CHO–K1, HEK293, 293–EBNA pIN–векторы (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264: 5503–5509 (1989); pET–векторы (Novagen, Мэдисон, Висконсин). В качестве альтернативы рекомбинантный экспрессионный вектор можно транскрибировать и транслировать *in vitro*, например, применяя регуляторные последовательности промотора T7 и полимеразы T7, и систему трансляции *in vitro*. Предпочтительно вектор содержит промотор, предшествующий сайту клонирования, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид. Примеры промоторов, которые могут быть включены и выключены, включают в себя промотор lac, промотор T7, промотор trc, промотор tac и промотор trp.

[131] Таким образом в данном документе предусмотрены векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Jagged1, которые облегчают экспрессию рекомбинантного Jagged1. В различных вариантах осуществления векторы содержат функционально связанную нуклеотидную последовательность, которая регулирует экспрессию Jagged1. Вектор может содержать или быть связан с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами, облегчающими экспрессию. Примеры таких элементов включают в себя сильные экспрессирующие промоторы (например, промотор/энхансер IEV IE человека, промотор RSV, промотор SV40, промотор SL3–3, промотор MMTV или промотор LTR HIV, промотор EF1–альфа, промотор CAG), последовательности поли (A) эффективной терминации, точку начала репликации для продукта плазмиды в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотикам в качестве маркера

селекции и/или удобный сайт клонирования (например, полилинкер). Векторы также могут содержать индуцибельный промотор, в противоположность конститутивному промотору, такому как ЦМВ IE. В одном аспекте предусмотрена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую полипептид Jagged1, который функционально связан с тканеспецифическим промотором, который способствует экспрессии последовательности в метаболически важной ткани, такой как ткань печени или поджелудочной железы.

[132] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты и векторы Jagged1, раскрытые в данном документе. В различных вариантах осуществления вектор или нуклеиновую кислоту встраивают в геном клетки-хозяина, в других вариантах осуществления вектор или нуклеиновая кислота размещена внехромосомно.

[133] Предложены рекомбинантные клетки, такие как дрожжи, бактериальные (например, *E. coli*) и клетки млекопитающих (например, иммортализованные клетки млекопитающих), содержащие такую нуклеиновую кислоту, вектор или комбинации любого из них или обоих из них. В различных вариантах осуществления предусмотрены клетки, содержащие неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такие как плазида, космида, фагида или линейный элемент экспрессии, который содержит кодирующую последовательность для экспрессии полипептида Jagged1.

[134] Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид Jagged1, предусмотренный в данном документе, может быть введен в клетку-хозяина путем трансформации или трансфекции. Способы трансформации клетки экспрессионным вектором хорошо известны.

[135] Нуклеиновая кислота, кодирующая Jagged1, может находиться в клетке-хозяине или животном-хозяине и/или быть доставлена им посредством вирусного вектора. В качестве такого может быть применен любой подходящий вирусный вектор. Вирусный вектор может содержать любое количество вирусных полинуклеотидов, отдельно или в сочетании с одним или большим количеством вирусных белков, которые способствуют доставке, репликации и/или экспрессии нуклеиновой кислоты по изобретению в желаемой клетке-хозяине. Вирусный вектор может представлять собой полинуклеотид, содержащий все или часть вирусного генома, конъюгата вирусного белка/нуклеиновой кислоты, вирусоподобной частицы (VLP) или интактной вирусной частицы, содержащей вирусные нуклеиновые кислоты и нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид Jagged1. Вирусный вектор вирусной частицы может содержать вирусную частицу дикого типа или модифицированную вирусную частицу. Вирусным вектором может быть вектор, который требует наличия другого вектора или вируса дикого типа для репликации и/или экспрессии (например, вирусный вектор может быть хелпер-зависимым вирусом), такой как аденовирусный векторный ампликон. Как правило, такие вирусные векторы состоят из вирусной частицы дикого типа или вирусной частицы, модифицированной по содержанию белка и/или нуклеиновой кислоты, для

увеличения трансгенной способности или содействия трансфекции и/или экспрессии нуклеиновой кислоты (примеры таких векторов включают вирус герпеса/ампликоны AAV). Как правило, вирусный вектор аналогичен и/или получен из вируса, который обычно инфицирует людей. Подходящие частицы вирусного вектора в этом отношении включают в себя, например, аденовирусные векторные частицы (включая любой вирус или полученный из вируса *Adenoviridae*), аденоассоциированные вирусные векторные частицы (частицы вектора AAV) или другие парвовирусы и парвовирусные векторные частицы, папилломавирусные векторные частицы, флавивирусные векторы, альфавирусные векторы, вирусные векторы герпеса, векторы вируса оспы, ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы.

[136] Полипептид Jagged1, экспрессированный, как описано в данном документе, может быть выделен с применением стандартных способов очистки белка. Полипептид Jagged1 может быть выделен из клетки, в которой он экспрессируется естественным образом или он может быть выделен из клетки, которая была сконструирована для экспрессии Jagged1, например клетки, которая не экспрессирует Jagged1 в естественных условиях.

[137] Способы очистки белка, которые могут быть использованы для выделения полипептида Jagged1, а также сопутствующие материалы и реагенты, известны из уровня техники. Дополнительные способы очистки, которые могут быть пригодны для выделения полипептида Jagged1, можно найти в ссылках, таких как Bootcov MR, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11514–9, Fairlie WD, 2000, *Gene* 254: 67–76.

[138] В данном документе предусмотрены антагонистические антиген–связывающие белки, которые связывают Jagged1, включая Jagged1 человека (hJagged1). В одном варианте осуществления Jagged1 человека имеет последовательность, такую как представлено под SEQ ID NO: 353.

[139] Предусмотренные антиген–связывающие белки представляют собой полипептиды, в которые встраивают или к которым присоединяют одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR), как описано в данном документе. В некоторых антиген–связывающих белках CDR встроены в "каркасную" область, которая ориентирует CDR таким образом, что достигаются подходящие антиген–связывающие свойства CDR. Определенные антиген–связывающие белки, описанные в данном документе, являются антителами или получены из антител. В других антиген–связывающих белках, последовательности CDR встраивают в различные типы белковых каркасов. Ниже дополнительно описываются различные структуры.

[140] Антиген–связывающие белки, которые описаны в данном документе, имеют множество применений. Антиген–связывающие белки, например, пригодны в анализах специфического связывания, аффинной очистке Jagged1 и в скрининговых анализах для идентификации других антагонистов активности Jagged1. Другие применения антиген–связывающих белков включают, например, диагностику заболеваний или состояний, связанных с Jagged1, и скрининговые анализы для определения наличия или отсутствия

Jagged1. Учитывая, что предусмотренные антиген–связывающие белки являются антагонистами, белки, связывающие антиген Jagged1, имеют ценность в терапевтических способах, в которых необходимо лечение заболеваний легкого, уменьшение уровня содержания муцина и уменьшение уровня бокаловидных клеток. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования дифференциации секреторных клеток у субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антиген–связывающего белка, который специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 353. В одном варианте осуществления антиген–связывающий белок содержит CDR и/или VH и VL, раскрытые в настоящей заявке.

[141] Предусмотрены различные селективные связывающие средства, пригодные для модулирования активности Jagged1. Такие средства включают, например, антиген–связывающие белки, которые содержат антигенсвязывающий домен (например, scFvs, доменные антитела и полипептиды с антиген–связывающей областью) и специфически связывается с полипептидом Jagged1, в частности Jagged1 человека.

[142] В целом, предусмотренные антиген–связывающие белки обычно содержат одну или несколько CDR, как описано в данном документе (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых случаях антиген–связывающий белок содержит (а) полипептидную структуру и (b) одну или несколько CDR, которые введены в полипептидную структуру и/или соединены с ней. Полипептидная структура может принимать различные формы. Например, она может быть или содержать структуру встречающегося в природе антитела, или его фрагмента или варианта, или может быть полностью синтетической по своей природе. Примеры различных полипептидных структур дополнительно описаны ниже.

[143] В некоторых вариантах осуществления полипептидная структура антиген–связывающих белков является антителом или получена из антитела. Соответственно, примеры определенных предусмотренных антиген–связывающих белков включают без ограничения моноклональные антитела, биспецифические антитела, мини–антитела, доменные антитела, такие как Nanobodies®, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе "миметиками антитела"), химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, гибриды антител и части или фрагменты каждого, соответственно. В некоторых случаях антиген–связывающий белок является иммунологическим фрагментом полного антитела (например, Fab, Fab', F(ab')₂). В других случаях антиген–связывающий белок представляет собой scFv, который использует CDR из антитела по настоящему изобретению.

[144] В одном варианте осуществления антиген–связывающий белок, взаимодействующий с Jagged1, имеет один или несколько следующих видов активности:

[145] (а) связывает Jagged1 человека так, что KD составляет ≤ 200 нМ, составляет ≤ 150 нМ, составляет ≤ 100 нМ, составляет ≤ 50 нМ, составляет ≤ 10 нМ, составляет ≤ 5 нМ, составляет ≤ 2 нМ или составляет ≤ 1 нМ, например, как измерено посредством методики поверхностного плазмонного резонанса или кинетического исключения.

[146] (b) имеет период полужизни в сыворотке крови человека по меньшей мере 3 дня;

[147] Некоторые предусмотренные антиген–связывающие белки характеризуются скоростью ассоциации (k_a) для Jagged1, составляющей по меньшей мере $10^4/\text{М} \times \text{секунд}$, по меньшей мере $10^5/\text{М} \times \text{секунд}$ или по меньшей мере $10^6/\text{М} \times \text{секунд}$, как измерено, например, как описано ниже. Определенные предложенные антиген–связывающие белки имеют низкую скорость отсоединения или константу отсоединения. Некоторые антиген–связывающие белки, например, имеют k_d (константу отсоединения) $1 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, или $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, или $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, или $1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок характеризуется KD (аффинностью равновесного связывания), составляющей менее 25 пМ, 50 пМ, 100 пМ, 500 пМ, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ или 50 нМ.

[148] В зависимости от анализа, связывание антиген–связывающего белка с его мишенью также может быть измерено как EC50 (концентрация антиген–связывающего белка, которая дает полумаксимальный ответ при связывании с мишенью). EC50 для антиген–связывающего белка, взаимодействующего с Jagged1, по настоящему изобретению можно определить посредством инкубирования различных концентраций антиген–связывающего белка с клетками, экспрессирующими Jagged1. Белки, связывающие антиген Jagged1 по настоящему изобретению могут характеризоваться EC50 менее 200 нМ, 150 нМ, 125 нМ, 100 нМ, 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ или 30 нМ.

[149] IC50 (полумаксимальная ингибирующая концентрация: мера эффективности антиген–связывающего белка в подавлении специфической биологической или биохимической функции) также может применяться для измерения активности антиген–связывающего белка в отношении Jagged1. IC50 может быть измерена с применением функционального анализа. Например, связанный с клеткой или растворимый лиганд Jagged1 может использоваться для активации рецептора Notch, экспрессируемого клеткой, где путь активации рецептора Notch может быть измерен с использованием репортерного гена, такого как ген люциферазы. В одном варианте осуществления рецептор Notch, экспрессируемый репортерной клеткой, представляет собой Notch 2. Белки, связывающие антиген Jagged1 по настоящему изобретению могут характеризоваться IC50 менее 200 нМ, 150 нМ, 125 нМ, 100 нМ, 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ или 2 нМ.

[150] В другом аспекте предусматривается антиген–связывающий белок, имеющий период полужизни, по меньшей мере, один день *in vitro* или *in vivo* (например, при введении человеку). В одном варианте осуществления антиген–связывающий белок имеет период полужизни по меньшей мере три дня. В различных других вариантах осуществления антиген–связывающий белок имеет период полужизни 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или 60 дней или дольше. В другом варианте осуществления антиген–связывающий белок дериватизирован или модифицирован таким образом, что он имеет

более длительный период полужизни по сравнению с недериватизированным или немодифицированным антителом. В другом варианте осуществления антиген-связывающий белок содержит точечные мутации для увеличения периода полужизни в сыворотке крови. Дополнительные детали относительно таких мутантных и дериватизированных форм приведены ниже.

[151] Некоторые из предложенных антиген-связывающих белков имеют структуру, обычно связанную с встречающимися в природе антителами. Структурные единицы данных антител обычно содержат один или несколько тетрамеров, каждый из которых состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, хотя некоторые виды млекопитающих также продуцируют антитела, имеющие только одну тяжелую цепь. В типичном антителе каждая пара или двухэлементная структура содержит одну полноразмерную "легкую" цепь (в некоторых вариантах осуществления приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную "тяжелую" цепь (в некоторых вариантах осуществления приблизительно 50–70 кДа). Каждая отдельная цепь иммуноглобулина состоит из нескольких "иммуноглобулиновых доменов", каждый из которых состоит из около 90–110 аминокислот и отображает характерную модель фолдинга. Эти домены являются основными единицами, из которых состоят полипептиды антител. Аминоконцевой участок каждой цепи, как правило, включает в себя переменный домен, который является ответственным за распознавание антигена. Карбоксиконцевой участок эволюционно является более консервативным, чем другой конец этой цепи, и называется "константной областью" или "С-областью". Легкие цепи иммуноглобулина человека, как правило, классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда, и каждая из них содержит один переменный домен и один константный домен. Как правило, тяжелые цепи классифицируются как цепи мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG имеет несколько подтипов, в том числе, не ограничиваясь лишь этими: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Подтипы IgM включают в себя IgM1 и IgM2. Подтипы IgA включают в себя IgA1 и IgA2. У людей изотипы IgA и IgD содержат четыре тяжелых цепи и четыре легкие цепи; изотипы IgG и IgE содержат две тяжелых цепи и две легкие цепи, и изотип IgM содержит пять тяжелых цепей и пять легких цепей. С-область тяжелой цепи, как правило, содержит один или несколько доменов, которые могут отвечать за эффекторную функцию. Количество доменов константной области тяжелой цепи будет зависеть от изотипа. Например, каждая из тяжелых цепей IgG содержит три домена С-области, известные как CH1, CH2 и CH3. Предусмотренные антитела могут иметь любой из этих изотипов и подтипов. В некоторых вариантах осуществления антитело к Jagged1 относится к подтипу IgG1, IgG2 или IgG4. Термин "антитело к Jagged1" и "антитело, связывающееся с Jagged1" применяют взаимозаменяемо во всей настоящей заявке и графических материалах. Оба термина относятся к антителу, которое связывается с Jagged1.

[152] В полноразмерных легких и тяжелых цепях переменные и константные области соединены областью "J", состоящей из приблизительно двенадцати или более

аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит область "D", состоящую из приблизительно десяти или более аминокислот. См., например, *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press (включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей). Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь обычно образуют антигенсвязывающий участок.

[153] Для антител предложенных в данном документе, вариабельные области цепей иммуноглобулинов, как правило, демонстрируют такую же общую структуру, содержащую относительно консервативные каркасные области (FR), соединенные тремя гипервариабельными областями, чаще называемыми "определяющими комплементарность областями" или CDR. CDR из двух цепей каждой пары тяжелой цепи/легкой цепи, указанных выше, как правило выравнивают по каркасным областям для образования структуры, которая специфически связывается с конкретным эпитопом на Jagged1. От N-конца к C-концу, встречающиеся в природе вариабельные области как легкой, так и тяжелой цепи, как правило, соответствуют следующему порядку данных элементов: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Была разработана система нумерации для присвоения номеров аминокислотам, которые занимают положения в каждом из данных доменов. Данная система нумерации определена в *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 and 1991, NIH, Bethesda, Md.) или Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901–917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342:878–883.

[154] Информация по последовательностям для конкретных антител, полученных и идентифицированных, как описано в примерах ниже, обобщена в таблице 1. Таким образом, в одном варианте осуществления антиген–связывающий белок представляет собой антитело с последовательностями CDR, вариабельного домена и легкой и тяжелой цепей, как указано в одной из строк таблицы 1.

[155] SEQ ID NO были присвоены последовательностям вариабельной легкой цепи, вариабельной тяжелой цепи, легкой цепи, тяжелой цепи, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 антител и их фрагментов по настоящему изобретению и показаны в таблице 1. Также SEQ ID NO были присвоены полинуклеотидам, кодирующим последовательности вариабельной легкой цепи, вариабельной тяжелой цепи, легкой цепи, тяжелой цепи, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 антител и их фрагментов по настоящему изобретению и показаны в таблице 2. Антиген–связывающие белки по настоящему изобретению могут быть идентифицированы посредством SEQ ID NO, но также по названию конструкции (например, 15D11.1) или идентификационному номеру (например, iPS:480499).

[156] Различные вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи, предусмотренные в данном документе, показаны в таблице 3. Каждая из данных вариабельных областей может быть присоединена к константным областям тяжелой или легкой цепи, чтобы образовывать полную тяжелую и легкую цепь антитела соответственно. Кроме того, каждая из сформированных таким образом последовательностей тяжелых и легких цепей может быть объединена для образования

полной структуры антитела.

Таблица 1. Аминокислотные SEQ ID NO.

Идентификационный №	Антитело	VL	VH	CDR L1	CDR L2	CD RL3	CDR H1	CDRH 2	CD RH3
iPS:480496	17B3.1	267	268	4	5	6	136	137	138
iPS:480499	15D11.1	271	272	10	11	12	142	143	144
iPS:480522	4F5.1	275	276	16	17	18	148	149	150
iPS:481499	1A12.1	279	280	22	23	24	154	155	156
iPS:480526	6B1.1	283	284	28	29	30	160	161	162
iPS:480529	1G9.1	287	288	34	35	36	166	167	168
iPS:480533	6E12.1	291	292	40	41	42	172	173	174
iPS:480548	9G5.1	295	296	46	47	48	178	179	180
iPS:480551	5A12.1	299	300	52	53	54	184	185	186
iPS:480555	6B11.1	303	304	58	59	60	190	191	192
iPS:480558	8C8.1	307	308	64	65	66	196	197	198
iPS:480561	8G12.1	311	312	70	71	72	202	203	204
iPS:480572	9D3.1_LC1	315	316	76	77	78	208	209	210
iPS:480573	9D3.1_LC2	319	320	82	83	84	214	215	216
iPS:481500	6C9.1	323	324	88	89	90	220	221	222
iPS:481501	4E2.1	327	328	94	95	96	226	227	228
iPS:481983	3D5.1	331	332	100	101	102	232	233	234
iPS:481984	5D11.1	335	336	106	107	108	238	239	240
iPS:481989	1H1.1	339	340	112	113	114	244	245	246
iPS:480570	9E8.1	343	344	118	119	120	250	251	252

iPS:480538	2B6.1	347	348	124	125	126	256	257	258
iPS:480569	1D2.1	351	352	130	131	132	262	263	264

Таблица 2. Нуклеотидные SEQ ID NO.

Идентифи

кационный №	Антитело	VL	VH	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:480496	17B3.1	265	266	1	2	3	133	134	135
iPS:480499	15D11.1	269	270	7	8	9	139	140	141
iPS:480522	4F5.1	273	274	13	14	15	145	146	147
iPS:481499	1A12.1	277	278	19	20	21	151	152	153
iPS:480526	6B1.1	281	282	25	26	27	157	158	159
iPS:480529	1G9.1	285	286	31	32	33	163	164	165
iPS:480533	6E12.1	289	290	37	38	39	169	170	171
iPS:480548	9G5.1	293	294	43	44	45	175	176	177
iPS:480551	5A12.1	297	298	49	50	51	181	182	183
iPS:480555	6B11.1	301	302	55	56	57	187	188	189
iPS:480558	8C8.1	305	306	61	62	63	193	194	195
iPS:480561	8G12.1	309	310	67	68	69	199	200	201
iPS:480572	9D3.1_LC1	313	314	73	74	75	205	206	207
iPS:480573	9D3.1_LC2	317	318	79	80	81	211	212	213
iPS:481500	6C9.1	321	322	85	86	87	217	218	219
iPS:481501	4E2.1	325	326	91	92	93	223	224	225
iPS:481983	3D5.1	329	330	97	98	99	229	230	231
iPS:481984	5D11.1	333	334	103	104	105	235	236	237

iPS:481989	1H1.1	337	338	109	110	111	241	242	243
iPS:480570	9E8.1	341	342	115	116	117	247	248	249
iPS:480538	2B6.1	345	346	121	122	123	253	254	255
iPS:480569	1D2.1	349	350	127	128	129	259	260	261

Таблица 3. Иллюстративные варибельные области легкой цепи и варибельные области тяжелой цепи: Нуклеотидные ("NA") и аминокислотные ("AA") последовательности

iPS:480496	17B3.1	NA	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CATCTTCCGTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTT GTCGGGCGAGTCAGGGTATTAG CGACTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTTTGCTGCATCCA GTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCC AGGTTTCAGCGGCAGTGAATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTACTATTGTCAACAG GCTAACAGTTTCCCGATCACCTT CGGCCAAGGGACACGACTGGAG ATTCAA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGTTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATGGTATGATGGAAGTAAT GAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCT GTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTG TATTACTGTGCGAGACATGACC ACAGTCACTACGGTTTTGACTA CTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTATCCTCA
			(SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 2)
		AA	DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCR ASQGISDWLAWYQQKPGKAPKL LIFAASSLQSGVPSRFSGSESGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPI TFGQGTRLEIQ	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGDSNEYYSADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARHDSHYGFDY WGQGTLVTVSS
			(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 4)
iPS:480499	15D11.1	NA	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC CTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC AGTCGATCACCATCTCCTGCACT GGAACCAGCAGTGCCGTTGGTG GTCATAACTTTGTCTCCTGGTAC CAACAGTACCCAGGCAAAGCCC CCAAACTCATGATTTATGAGGTC AGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTC TACTCGCTTCTCTGGCTCCAAGT CTGGCAACACGGCCTCCCTGAC CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAG GACGAGGCTGATTATTACTGCA GCTCTTATACAAGCAGCAGCAC TTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACC	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTG GTCCTGTGCTGGTGAAACCCAC AGAGACCCTCACGCTGACCTGC ACCGTCTCTGGGTTCTCACTCA GCAATGCTGAAATGGGTGTGA GCTGGATCCGTCAGCCCCCAGG GAAGGCCCTGGAGTGGCTTGC ACACCTTTTTTCGAATGACGAA AAATCCTACAGCACATCTCTGA AGAGCAGGCTCACCATCTCCA AGGACACCTCCAAAAGCCAGG TGGTCCTTACCATGACCGACCT GGACCCTGTGGACACAGCCAC CTATTACTGTGCACGGTCGTTT

iPS:480522	4F5.1		AGGCTGACCGTCCTA	AACTGGAAC TACGACTTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 6)
		AA	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT SSAVGGHNFVSWYQQYPGKAPK LMIYEVSNRPSGVSTRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTS SSTWVFGGGTRLTVL	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCT VSGFSLSNAEMGVSWIRQPPGK ALEWLAHLFSNDEKSYSTSLKSR LTISKDTSKSQVVLMTDLDLPVD TATYYCARSFNWNYDFDYWGQ GTLVTVSS
			(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 8)
		NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTC CAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCT GCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG GAGCAACTTAGCCTGGTACCAG CAGAAAGCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCGATGGTGCATCC ACCAGGGCCACTGGCATAACAG CCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTATAATAACTGGCCTACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGAT ATCAAA	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAGCAGTGGTAGTTACTACTGG GGCTGGATCCGCCAGCCCCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGAGTATCTATTATGGTGGGA ACACCTACTACAACCCGTCCCT CAAGAGTCGAGTCACCATATCC ATAGACACGTCCAAGAACCAG TTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCGCAGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGGGAGAACT GCGGAGGGCTTTTGATATCTGG GGCCAAGGGACAATGGTCACC GTCTCTTCA
			(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 10)
iPS:481499	1A12.1	AA	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVRSNLAWYQQKAGQAPRL LIDGA STRATGITARFSGSGS GTEF TLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNW PTFGPGTKVDIK	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGGSISSGSYYWGWIRQPPGKG LEWIGSIYYGGNTYYNPSLKS RV TISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCAGELRRAFDIWGQGTMV TVSS
			(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 12)
		NA	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA CTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGA AGACGGTAACCATCTCCTGCAC CCGCAGCAGTGACAGCATTGCC AGCAACTATGTGCAGTGGTACC AGCAGCGCCCGGGCAGTTCCCC CACC ACTGTGATCTTTGAGGATA ACCAAAGACCCTCTGGGGTCCC TGATCGGTTCTCTGGCTCCATCG ACAGCTCCTCCA ACTCTGCCTCC CTCACCATCTCTGGACTGAAGCC TGAGGACGAGGCTGACTACTAC TGTCAGTCTTATGATAGCAGCAA TCATGTGGTATTCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTTACTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATGGTATGATGGAAGTAAT AAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCT GTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCTGTG TATTACTGTGCGAGAGATCATG ACTACGGTGTCTGTACTACTT TGACTACTGGGGCCAGGGAAC

				CCTGGTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 14)
		AA	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTR SSDSIASNYVQWYQQRPGSSPTTV IFEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSNS ASLTISGLKPEDEADYYCQSYDSS NHVVFGGGTKLTVL	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSYYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSNKYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDHDYGVLYYF DYWGQGTLVTVSS
			(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 16)
iPS:480526	6B1.1	NA	TCCTTTGAACTGACACAGCCACC CTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGAC AGACGGCCAGGATCACCTGCTC TGGAGATGCATTGCCAAAGCAA TATGCTTATTGGTACCGGCAGAA GCCAGGCCAGGCCCTGTACTG GTAATATATAAAGACAGTGAGA GGCCCTCAGGGATCCATGAGCG ATTCTCTGGCTCCACCTCAGGGA CAACAGTCACGTTGACCATCAG TGGAGTCCAGGCAGAAGACGAG GCTGACTATTACTGTCAATCAAC AGACAGAAGAGGTACTGTGTTT GGCGGAGGGACCAAGTTGACCG TCCTA	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTG GTCCTACGCTGGTGAAACCCAC ACAGACCCTCACGCTGACCTGC ACCTTCTCTGGGTTCTCACTCA GCACTAGTGGAGTGGGTGTGG GCTGGATCCGTCAGCCCCCAGG AAAGGCCCTGGAGTGGCTTGC ACTCATTTATTGGAATGATGAT AAGCGCTACAGCCCATCTCTGA AGAGCAGGCTCACCATACCA AGGACACCTCCAAAACCAGG TGGTCCTTACAATGACCAACAT GGACCCTGTGGACACAGCCAC ATATTACTGTGCACACAGACAT GGCTACGATAGGATGCGTGAT GCTTTTGATATCTGGGGCCAAG GGACAATGGTCACCGTCTCTTC A
			(SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 18)
		AA	SFELTQPPSVSVSPGQTARITCSGD ALPKQYAYWYRQKPGQAPVLVI YKDSERPSGIHERFSGSTSGTTVTL TISGVQAEDEADYYCQSTDRRG TVFGGGTKLTVL	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTF SGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKAL EWLALIYWND DKRYSPSLKSRL TITKDTSKNQVVLTMNMDPVD TATYYCAHRHGYDRMRDAFDI WGQGTMTVTVSS
			(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 20)
iPS:480529	1G9.1	NA	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC AGACACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGATTTT TAGC AGCAGTTACTTAGCCTGGTACCA GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC AGGCTCCTCATCTCTGGTGCATC CAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTT CAGTGGCAGTGGGT CTGGGTCAGACTTCACTCTCACC ATCAGCAGACTGGAGCCTGAGG ATTTTGCAGTGTATTACTGT CAG CAGTATGGTAGCTCATGCAGTTT TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG ATCAAA	CAGGTGCAGTTGGTGCAGTCTG GGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTTTCTG CAAGGCATCTGGATACACCTTC ACCAGCTACTTTATACACTGGG TGCGACAGGCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGAATAA TCAACCCTAGTGGTGGTAGCAC AAGCTACGCACAGAAGTTCCA GGGCAGAGTCACCATGACCAG GGACACGTCCACGAGTACAGT CTACATGGAGCTTAGCAGCCTG AGATCTGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGATCAGG AGGGAGCAGTGGCTGGTACAG ACTACTACTTCTACGGTATGGA CGTCTGGGGCCAAGGGACCAC

				GGTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 22)
		AA	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRA SQIFSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI SGASSRATGIPDRFSGSGSGSDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSCSF GQGTKLEIK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYFIHWVRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDQEGAVAGTDYYF YGMDVWVGQGTITVTVSS
			(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 24)
iPS:480533	6E12.1	NA	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC ACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTAC ATAGTCATGGATACAGCTATTTG AATTGGTACCTGCAGAAGCCAG GGCAGTCTCCACAGCTCCTGATC CATTTGGGTTCTAATCGGGCCTC CGGGGTCCCTGACAGGTTCACT GGCAGTGGATCAGGCACAGAAT TTACACTGAGAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTT TATTACTGCATGCAAGTTCTGCT AACTCCGATCACCCCTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATTAAA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATCATATGATGGAAATAATA AATACTATGCAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGACCACGCTGT ATCTGCAAATGAACAGCCTGA GACCTGAGGACACGGCTGTGTT TACTGTGCGAGAGATGCCAGT GGGAGCTCCCTCTACCTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 26)
		AA	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRS SQSLLHSHGYSYLNWYLQKPGQS PQLLIHLGSNRASGVDPDRFSGSGS GTEFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ VLLTPITLGQGRLEIK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGNKNKYADSV KGRFTISRDNSTLYLQMNSLR PEDTAVFYCARDASGSSLYLDY WGQGTITVTVSS
			(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 28)
iPS:480548	9G5.1	NA	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC ACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGC ATAGTCATGGATACAACTATTTG AATTGGTACCTGCAGAAGCCAG GGCAGTCTCCACACCTCCTGATC TATTTGGGTTCTAATCGGGCCTC CGGGGTCCCTGACAGGTTCACT GGCAGTGGATCAGGCACAGAAT TTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTT TATTACTGCATGCAAGTTCTACA AACTCCGATCACCCCTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATTAAA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTT CAGTAACTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATCATATGATGGAAGTAAA AAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCT GTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCTGAGGACACGGCTGTG TATTACTGTGCGAGAGATGCCA GTGGGAGCTCCCTCTACTCTGA CTACTGGGGCCAGGGAATCCT GGTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 30)

IPS:480551	5A12.1	AA	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRS SQSLLHSHGYNYLNWYLQKPGQS PHLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGS GTEFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ VLQTPITLGQGTRLEIK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSNYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSKKYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDASGSSLYSDYW QGILVTVSS
			(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 32)
		NA	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC ACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGGGCCTCCTGC ATAGTCATGGATACCACTATTTG AATTGGTACCTGCAGAAGCCAG GGCAGTCTCCACAGCTCCTGATC TATTTGGGTTCTAATCGGGCCTC CGGGGTCCCTGACAGGTTCACT GGCAGTGGATCAGGCACAGAAT TTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTT TATTACTGCATGCAAGTTCTACA AACTCCGATCACCTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATTAAT	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGACAGTT ATATCAAAAGATGGAAGTTAT AAATACTATGCGGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCT GTATCTGCAAATGAACAGCCTG AGAGCTGAGGACACGGCTGTG TATTACTGTGCGAGGGATGCCA GTGGGAGCTCCCTCTACTTAGA CTACTGGGGCCAGGGTACCCTG GTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 34)
IPS:480555	6B11.1	AA	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRS SQGLLHSHGYHYLNWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGS SGTEFTLKISRVEAEDVGVYYCM QVLQTPITLGQGTRLEIK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVTVISKDGSKYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDASGSSLYLDYW QGTLVTVSS
			(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 36)
		NA	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACC CTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTCACCATCTCTTGTTT TGGAAGCAGCTCCAACATCGGA AGAAATACTGTAACTGGTACC AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCC CAAACCTCCTCATCTATAGTAATA ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCC TGACCGATTCTCTGGCTCCAAGT CTGGCACCTCAGTCTCCCTGGCC ATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGG ATGAGGCTGATTATTACTGTGCA GCATGGGATGACAGCCTGAATG GTGTGGTATTCGGCGGAGGGAC CAAGTTGACCGTCCTA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATGGTATGATGGAAGTAAT AAATACCATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGGACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGGGGGACTTT GCTTACTTCTACTACGGTATGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 38)
IPS:480555	6B11.1	AA	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGS SSNIGRNTVNWYQQLPGTAPKLLI	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK

iPS:480558	8C8.1		YSNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSVS LAISGLQSEDEADYYCAAWDDSL NGVVFGGGTKLTVL	GLEWVAVIWYDGSNKYHADSV KGRFTISRDNSKDTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAGDFAYFYYGMD VWGQGTTVTVSS
			(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 40)
		NA	TCCTATGAGCTGACCCAGCCACC CTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGAC AGACGGCCAGGATCACCTGCTC TGGAGATGCTTTGCCAAGGCAA TATACTTATTGGTACCAGCAGAA ACCAGGCCAGGCCCTGTTCTG GTGATATTTAAAGACACTGCGA GGCCCTCAGGGATCCCTGAGCG ATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGA CAACAGTCACGTTGACCATCAG TGGAGTCCAGGCAGAAGACGAG GCTGACTATTACTGTCAATCAAC AGACAGAAGTGGTACTGTGTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCG TCCTA	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTG GTCCTACGCTGGTGAACCCAC ACAGACCCTCACGCTGACCTGC ACCTTCTCTGGGTTCTCACTCA GCACTAGTGGAGTGGGTGTGG GCTGGATCCGTCAGCCCCCAGG AAAGGCCCTGGAGTGGCTTGC ACTCATTTATTGGAATGATGAT AAGCGCTACAGCCCATCTCTGA AGAGCAGGCTCACCATACCA AGGACACCTCCAAAAACCAGG TGGTCCTTACAATGACCAACAT GGACCCTGTGGACACAGCCAC ATATTACTGTGCACACAGACAT GGCTACGATAGGATGCGTGAT GCTTTTGATATCTGGGGCCAAG GGACAATGGTCACCGTCTCTTC A
			(SEQ ID NO: 41)	(SEQ ID NO: 42)
		AA	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSG DALPRQYTYWYQQKPGQAPVLVI FKDTARPSGIPERFSGSSSGTTVTL TISGVQAEDADYYCQSTDRSGT VFGGGTKLTVL	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTF SGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKAL EWLALIYWND DKRYSPSLKSRL TITKDTSKNQVVLMTNMDPVD TATYYCAHRHGYDRMRDAFDI WGQGTMTVTVSS
			(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 44)
iPS:480561	8G12.1	NA	GAAATTGTGATGACCCAGACTC CATTCTCTCTGTCCGTCACCCCT GGACAGCCGGCCTCCATCTCCTG CAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGC ATAGTAGTGGAAGACCTATTT GTATTGGTACCTGCAGAAGCCA GGCCAGCCTCCACAGCTCCTGAT CTATGAAGTTTCCAACCGGTTCT CTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAG TGGCAGCGGGTCAGGGACAGAT TTCACACTGAAAATCAGCCGGG TGGAGGCTGAGGATGTTGGGGT TTATTTCTGCATGCAAAGTATAC AGCTTCCGTGGACGTTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT TCCCAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAACAGTGGTGGTTACTACTGG AGCTGGATCCGCCAGCACCCA GGGAAGGGCCTGGAGTGGATT GGGTACATCTCTTACAGTGGGA GCACCTACTACAACCCGTCCCT CAAGAGTCGAGTTACCATATCA GTAGACACGTCTAAGAACCAG TTCTCCCTGAGGCTGAGCTCTG TGACTGCCGCGGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGAGAGA GCCCTACGGTGA CTACGGCTTT TGATATCTGGGGCCAAGGGAC AAAGGTCACCGTCTCTTCA
			(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 46)
		AA	EIVMTQTPFSLSVTPGQPASISCKS SQSLHSSGKTYLYWYLQKPGQP PQLLIYEVS NRFSGVDPDRFSGSGS	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VSGGSINSGGYYSWIRQHPGK GLEWIGYISYSGSTYYNPSLKS

iPS:480572	9D3.1_LC1		GTDFTLKISRVEADVGVYFCMQ SIQLPWTFGQGTKVEIK	VTISVDTSKNQFSLRLSSVTAAD TAVYYCARESPTVTTAFDIWGQ GTKVTVSS
			(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 48)
		NA	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCC ATCCTCCCTGTGTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGTGAGTCAGGACATTAAAC AGTTATTTAAATTGGTGTCGGCA GAAACCAGGGAAAGTTCCTCAG TTCCTGATCTATAGTGCATCCAA TTTGCAATCTGGAGTCCCATCTC GGTTCAGTGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACTTTCA GCGGCCTGCAGACTGAATATGT TGCACGTTATTACGGTCAACGG ACTTACAATGCCCTTCCGACGTT CGGCCTAGGGACCAGGGCGGAA ATCAAA	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCC TCACAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAGCAGTGGTGGTTACGACTG GAGCTGGATCCGCCAGCACCC AGGGAAGGGCCTGGAGTGGAT TGGGAACATTTATTACAGTGGG AGGACCTACTACAACCCGTCCC TCAAGAGTCGAATTACCATATC AGTAGACACGTCTAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT GTGACTGCCGCGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGATC GCCCTTATGGAGGTAATTCCGG CTACTACTACGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCCCA
			(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 50)
		AA	DIQLTQSPSSLCASVGDRVITICR VSQDINSYLNWCRQKPGKVPQFLI YSASNLSQGVPSRFSGSGSGTDF LTFSGLQTEYVARYYGQRTYNAL PTFGLGTRAEIK	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VSGGSISSGGYDWSWIRQHPGK GLEWIGNIYYSGRTYYNPSLKSR ITISVDTSKNQFSLKLSVTAADT AVYYCARDRPYGGNSGYYYGM DVWGQGTTVTVSP
			(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 52)
iPS:480573	9D3.1_LC2	NA	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC AGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGACTATTAGC AGCAGCTACTTAGCCTGGTACC AGCAGAGACCTGGCCAGGCTCC CAGGCTCCTTATGTATGGTGCAT CCAACAGGGTCATTGGCATCCC AGTCAGGTTCAGTGGCGGTGGG TGTGGGACAGACTTCACTTTCAC CATCAGCAGACTGGATCCTGAA GATTTTGCAGTGTATTACTGTCA GCAGTATGGTAACTACCCATGT GCAGTTTTGGCCAGGGGACCAA GGTGGAGATCAAA	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCC TCACAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAGCAGTGGTGGTTACGACTG GAGCTGGATCCGCCAGCACCC AGGGAAGGGCCTGGAGTGGAT TGGGAACATTTATTACAGTGGG AGGACCTACTACAACCCGTCCC TCAAGAGTCGAATTACCATATC AGTAGACACGTCTAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT GTGACTGCCGCGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGATC GCCCTTATGGAGGTAATTCCGG CTACTACTACGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCCCA
			(SEQ ID NO: 53)	(SEQ ID NO: 54)
		AA	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQTISSSYLAWYQQRPGQAPRL MYGASNRVIGIPVRFSGGGCGTDF	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VSGGSISSGGYDWSWIRQHPGK GLEWIGNIYYSGRTYYNPSLKSR

iPS:481500	6C9.1		TFTISRLDPEDFAVYYCQQYGNSP MCSFGQGTKVEIK	ITISVDTSKNQFSLKLRSVTAADT AVYYCARDRPYGGNSGYYYGM DVWGQGTTVTVSP
			(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 56)
		NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTC CAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGGAGAGAGCCACCCTCTCCT GCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG GAGCAACTTAGCCTGGTACCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCGATGGTGCATCC ACCAGGGCCACTGGCATCACAG CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTATAATAACTGGCCTACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGAT ATCAAA	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAGCAGTAGTAGTTACTATTGG GGCTGGATCCGCCAGCCCCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGAGTATCTATTATGGTGGGA ACACCTACTACAACCCGTCCCT CAAGAGTCGAGTCACCATATCC GTAGACACGTCCAAGAACCAG TTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCGCAGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGGGAGAACT GCGGAGGGCTTTTGATATCTGG GGCCAAGGGACAATGGTCACC GTCTCTTCA
			(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 58)
		AA	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRL IDGASTRATGITARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP TFGPGTKVDIK	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGGSISSSYWGWIRQPPGKG LEWIGSIYYGGNTYYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCAGELRRAFDIWGQGT MTVSS
			(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 60)
iPS:481501	4E2.1	NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTC CAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCT GCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG GAGCAACTTAGCCTGGTACCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCGATGGTGCATCC ACCAGGGCCACTGGCATCACAG CCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAGTATAATAATTGGCCTACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGAT ATCAAA	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAGCAGTGGTAGTTACTACTGG GGCTGGATCCGCCAGCCCCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGAGTATCTATTATGGTGGGA ACACCTACTACAACCCGTCCCT CAAGAGTCGAGTCACCATATCC GTAGACACGTCCAAGAACCAG TTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCGCAGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGGGAGAACT GCGGAGGGCTTTTGATATCTGG GGCCAAGGGACAATGGTCACC GTCTCTTCA
			(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 62)
		AA	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRL IDGASTRATGITARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP TFGPGTKVDIK	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGGSISSGSYYWGWIRQPPGKG LEWIGSIYYGGNTYYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCAGELRRAFDIWGQGT MT

				VTVSS
			(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 64)
iPS:481983	3D5.1	NA	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTGTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCTCTT GCCGGGCAAGTCAGGACATTAG AAATGATTTAGGCTGGTATCAG CAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCGCCTGATTTATGTTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATT TGGGACAGAATTCACCTCTCACA ATCAGCAGCCTGCAGCGTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTCTA CAGCATAATATTTACCCGTGCAG TTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG GAGATCAAA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTT CAGTAGCTTTGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAATT TTATCATTTGATGGAAATAATA AATACTATGCAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGGTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGA GAGCTGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGAGGGGG GGTATAACTGGAACACGACTT TGACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 66)
		AA	DIQMTQSPSSLCASVGDRTISCR ASQDIRNDLGWYQQKPGKAPKRL IYVASSLQSGVPSRFSGSGFGTEFT LTISSLQREDFATYYCLQHNIYPC FGQGTKLEIK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSFGMHWRQAPGKG LEWVAILSFDGNNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLMNSLRAE DTAVYYCAREGGYNWNYDFDY WGQGLTVTVSS
			(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 68)
iPS:481984	5D11.1	NA	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC TGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGAC AGACAGTCAGGATCACATGTCA AGGAGACAGCCTCAGAACCTAT TATGCAAGCTGGTACCAGCAGA AGCCAGGACAGGCCCTGTACT TGTCATCTATGGTAAAAACATCC GGCCCTCAGGGATCCCAGACCG ATTCTCTGCCTCCAGGTCAGGAA ATACAGCTGCCTTGACCATCACT GGGGCTCAGGCGGAAGATGAGG CTGACTATTACTGTAACCTCCCGG GACAGCAGTGGTGACCATGTGA TATTCGGCGGAGGGACCAAGGT GACCGTCCTA	CAGGTGCAACTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCGT CAGCAGTGGTGGTGACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCC AGGGAAGGGACTGGAGTGGAT TGGTTATATCTATTACACTGGG AGCACCAACTACAACCCCTCCC TCAAGAGTCGAGTCACCATATC AGTAGACACGTTCAAGCACCA GTTCTCCGTGAATCTGACCTCT GTGACCGCTGCGGACACGGCC GTGTATTATTGTGCGAGATCGG GTGTAGCAATGGCTCGCTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCCT GGTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 70)
		AA	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQG DSLRTYYASWYQQKPGQAPVLVI YGKNIRPSGIPDRFSASRSGNTAA LTITGAQAEDEADYYCNSRDSSG DHVIFGGGTVTVL	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCT VSGGSVSSGGDYWSWIRQPPGK GLEWIGYIYYTGSTNYPNPSLKSR VTISVDTFKHQFSVNLTSTVAAD TAVYYCARSGVAMARFDYWGQ GTLVTVSS
			(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 72)

iPS:481989		1H1.1		NA	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA CTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGA AGACGGTAACCATCTCCTGCAC CCGCAGCAGTGGCAGCATTGTC AGCAACTATGTGCAGTGGTACC AACAGCGCCCCGGGCAGTTCCCC CACCATTGTGATCTATGAGGATA ATCAAAGACCCTCTGGGGTCCCT GATCGGTTCTCTGGCTCCATCGA CAGCTCCTCGAACTCTGCCTCCC TCACCATCTCTGGACTGAAGACT GAGGACGAGGCTGACTACTATT GTCAGTCTTATGATAGCAGCAAT CAGGTGTTTCGGCGGAGGGACCA AGCTGACCGTCCTA	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT TCACAGACCCTGTCCCTCATCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAGCAGTGGTGGCTACCACTG GAGCTGGATCCGCCAGCACCC AGGGAAGGGCCTGGAGTGGAT TGGGTACATCTATTACAGTGGG AGCACCTACTACAACCCGTCCC TCAAGAGTCGAGTTACCATATC AGTAGACACGTCTAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCT GTGACTGCCGCGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAGAGAG ACTACGGTGGTAAAGGGGTAC TTCGATCTCTGGGGCCGTGGCA CCCTGGTCACTGTCTCCTCA
				(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 74)	
				AA	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTR SSGSIVSNYVQWYQQRPGSSPTIVI YEDNQRPSPGVDRFSGSIDSSNS ASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSS NQVFGGGTKLTVL	QVQLQESGPLVKPSQTLSLICT VSGGSISSGGYHWSWIRQHPGK GLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKS VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARETTVVKGYFDLWG RGTLLTVSS
				(SEQ ID NO: 75)	(SEQ ID NO: 76)	
iPS:480570		9E8.1		NA	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACC CTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTCACCATCTCTTGTTT TGGAAGCAGCTCCAACATCGGA AGTAATTATGTATTCTGGTACCA GCAGCTCCCAGGAACGGCCCCC AAACTCCTCATCTTTAGGAATAA TCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCT GACCGATTCTTTGGCTCCAAGTC TGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA TCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGA TGAGGCTGATTATTACTGTGCAG CATGGGATGACAGCCTGAGTGG TTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACC AAGCTGACCGTCCTA	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCTTGGTAAAGCCT GGGGGGTCCCTTAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTTACGCCTGGATGGGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGATTGGCCGT ATTAAAAGCAAACTGATGGT GGGACAACAGACTACGCTGCA CCCGTGAAAGGCAGATTACACC ATCTCAAGAGATGATTCAAAA AACACGCTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAAAACCGAGGACA CAGCCGTGTATTACTGTACCAC AGATGGGGCACTGGCCCCCA CGGCTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
				(SEQ ID NO: 77)	(SEQ ID NO: 78)	
				AA	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVFWYQQLPGTAPKLLI FRNNQRPSGVDRFFGSKSGTSAS LAISGLRSEDEADYYCAAWDDSL SGWVFGGGTKLTVL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AASGFTFSYAWMGWVRQAPGK GLEWIGRIKSKTDGGTTDYAAP VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCTTDGALAPHGY WGQGTLLTVSS
				(SEQ ID NO: 79)	(SEQ ID NO: 80)	
8053	2B6.1	1	NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTC CAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT	

iPS:480569	1D2.1		GGGGATAGAGCCACCCTCTCCT GCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG AAGCAACTTAGCCTGGTACCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCC ACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG CAATACACTGACTGGCCCACTTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATCAAA	TCACAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCAT CAGCAGTGGTGGTTACTTCTGG AGCTGGATCCGCCAGCACCCA GGGAAGGGCCTGGAGTGGATT GGGTACATCTATTACAGTGGGA GCACCTACTACAACCCGTCCCT CAAGAGTCGAGTTACCATATCA GTAGACACGTCTAAGAACCAG TTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACTGCCGCGGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGG AGCAGCAGCCGGCTTTGACTAT TGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 81)	(SEQ ID NO: 82)
		AA	EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSCR ASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRL IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQYTDWPT FGGGTKVEIK	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VSGGSISSGGYFWSWIRQHPGKG LEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARWGAAAGFDYWQGQ TLVTVSS
			(SEQ ID NO: 83)	(SEQ ID NO: 84)
	1D2.1	NA	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC ACTCTCCCTGCCCCGTACCCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTAC ATAGTCATGGATACAGCTATTTG AATTGGTACCTGCAGAAGCCAG GGCAGTCTCCACAGCTCCTGATC CATTTGGGTTCTAATCGGGCCTC CGGGGTCCCTGACAGGTTCACT GGCAGTGGATCAGGCACAGAAT TTACACTGAGAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTT TATTATTGCATGCAAGTTCTGCT AACTCCGATCACCCCTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATTAAA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTT CAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATCATATGATGGAAATAATA AATACTATGCAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGA GAGCTGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATGCCA GTGGGAGCTCCCTCTACCTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCTCA
			(SEQ ID NO: 85)	(SEQ ID NO: 86)
		AA	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRS SQSLLHSHGYSYLNWYLQKPGQS PQLLIHLGSNRASGVPDFRSGSGS GTEFTLRISRVEAEDGVVYYCMQ VLLTPITLGQGRLEIK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGNNKYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDASGSSLYLDY WGQGTTLVTSS
			(SEQ ID NO: 87)	(SEQ ID NO: 88)

Таблица 4. Иллюстративные нуклеотидные ("NA") и аминокислотные ("AA") последовательности CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3

Таблица 4А. Иллюстративные нуклеотидные ("NA") и аминокислотные ("AA") последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3

Идентификационный №	Антитело	Тип	CDRL1	CDRL2	CDRL3
iPS:480496	17B3.1	NA	CGGGCGAGTCAGGGTATTAGC GACTGGTTAGCC	GCTGCATCCAGTTTGCAAAGT	CAACAGGCTAACAGTTTCCCG ATCACC
			(SEQ ID NO: 89)	(SEQ ID NO: 90)	(SEQ ID NO: 91)
		AA	RASQGISDWLA	AASSLQS	QQANSFPIT
			(SEQ ID NO: 92)	(SEQ ID NO: 93)	(SEQ ID NO: 94)
iPS:480499	15D11.1	NA	ACTGGAACCAGCAGTGCCGTT GGTGGTCATAACTTTGTCTCC	GAGGTCAGTAATCGGCCCTCA	AGCTCTTATACAAGCAGCAGC ACTTGGGTG
			(SEQ ID NO: 95)	(SEQ ID NO: 96)	(SEQ ID NO: 97)
		AA	TGTSSAVGGHNFVS	EVSNRPS	SSYTSSSTWV
			(SEQ ID NO: 98)	(SEQ ID NO: 99)	(SEQ ID NO: 100)
iPS:480522	4F5.1	NA	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGG AGCAACTTAGCC	GGTGCATCCACCAGGGCCACT	CAGCAGTATAATAACTGGCCT ACT
			(SEQ ID NO: 101)	(SEQ ID NO: 102)	(SEQ ID NO: 103)
		AA	RASQSVRSNLA	GASTRAT	QQYNNWPT
			(SEQ ID NO: 104)	(SEQ ID NO: 105)	(SEQ ID NO: 106)
iPS:481499	1A12.1	NA	ACCCGCAGCAGTGACAGCATT GCCAGCAACTATGTGCAG	GAGGATAACCAAAGACCCTCT	CAGTCTTATGATAGCAGCAAT CATGTGGTA
			(SEQ ID NO: 107)	(SEQ ID NO: 108)	(SEQ ID NO: 109)
		AA	TRSSDSIASNYVQ	EDNQRPS	QSYDSSNHVV
			(SEQ ID NO: 110)	(SEQ ID NO: 111)	(SEQ ID NO: 112)

iPS:480526	6B1.1	NA	TCTGGAGATGCATTGCCAAAG CAATATGCTTAT	AAAGACAGTGAGAGGCCCTC A	CAATCAACAGACAGAAGAGG TACTGTG
			(SEQ ID NO: 113)	(SEQ ID NO: 114)	(SEQ ID NO: 115)
		AA	SGDALPKQYAY	KDSERPS	QSTDRRGTV
			(SEQ ID NO: 116)	(SEQ ID NO: 117)	(SEQ ID NO: 118)
iPS:480529	1G9.1	NA	AGGGCCAGTCAGATTTTTAGC AGCAGTTACTTAGCC	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT	CAGCAGTATGGTAGCTCATGC AGT
			(SEQ ID NO: 119)	(SEQ ID NO: 120)	(SEQ ID NO: 121)
		AA	RASQIFSSSYLA	GASSRAT	QQYGSSCS
			(SEQ ID NO: 122)	(SEQ ID NO: 123)	(SEQ ID NO: 124)
iPS:480533	6E12.1	NA	AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTA CATAGTCATGGATACAGCTAT TTGAAT	TTGGGTTCTAATCGGGCCTCC	ATGCAAGTTCTGCTAACTCCG ATCACC
			(SEQ ID NO: 125)	(SEQ ID NO: 126)	(SEQ ID NO: 127)
		AA	RSSQSLLHSHGYSYLN	LGSNRAS	MQVLLTPIT
			(SEQ ID NO: 128)	(SEQ ID NO: 129)	(SEQ ID NO: 130)
iPS:480548	9G5.1	NA	AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTG CATAGTCATGGATACAACTAT TTGAAT	TTGGGTTCTAATCGGGCCTCC	ATGCAAGTTCTACAAACTCCG ATCACC
			(SEQ ID NO: 131)	(SEQ ID NO: 132)	(SEQ ID NO: 133)
		AA	RSSQSLLHSHGYNYLN	LGSNRAS	MQVLQTPIT
			(SEQ ID NO: 134)	(SEQ ID NO: 135)	(SEQ ID NO: 136)
iPS:480551	5A12.1	NA	AGGTCTAGTCAGGGCCTCCTG CATAGTCATGGATACCACTAT TTGAAT	TTGGGTTCTAATCGGGCCTCC	ATGCAAGTTCTACAAACTCCG ATCACC
			(SEQ ID NO: 137)	(SEQ ID NO: 138)	(SEQ ID NO: 139)
		AA	RSSQGLLHSHGYHYLN	LGSNRAS	MQVLQTPIT
			(SEQ ID NO: 140)	(SEQ ID NO: 141)	(SEQ ID NO: 142)
iPS:480555	6B11.1	NA	TCTGGAAGCAGCTCCAACATC GGAAGAAATACTGTAAAC	AGTAATAATCAGCGGCCCTCA	GCAGCATGGGATGACAGCCTG AATGGTGTGGTA
			(SEQ ID NO: 143)	(SEQ ID NO: 144)	(SEQ ID NO: 145)
		AA	SGSSSNIGRNTVN	SNNQRPS	AAWDDSLNGVV
			(SEQ ID NO: 146)	(SEQ ID NO: 147)	(SEQ ID NO: 148)

iPS:480558	8C8.1	NA	TCTGGAGATGCTTTGCCAAGG CAATATACTTAT	AAAGACACTGCGAGGCCCTCA	CAATCAACAGACAGAAGTGG TACTGTG
			(SEQ ID NO: 149)	(SEQ ID NO: 150)	(SEQ ID NO: 151)
		AA	SGDALPRQYTY	KDTARPS	QSTDRSGTV
			(SEQ ID NO: 152)	(SEQ ID NO: 153)	(SEQ ID NO: 154)
iPS:480561	8G12.1	NA	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTG CATAGTAGTGGAAGACCTAT TTGTAT	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT	ATGCAAAGTATACAGCTTCCG TGGACG
			(SEQ ID NO: 155)	(SEQ ID NO: 156)	(SEQ ID NO: 157)
		AA	KSSQSLHSSGKTYLY	EVSNRFS	MQSIQLPWT
			(SEQ ID NO: 158)	(SEQ ID NO: 159)	(SEQ ID NO: 160)
iPS:480572	9D3.1_L C1	NA	CGGGTGAGTCAGGACATTAAC AGTTATTTAAAT	AGTGCATCCAATTGCAATCT	CAACGGACTTACAATGCCCTT CCGACG
			(SEQ ID NO: 161)	(SEQ ID NO: 162)	(SEQ ID NO: 163)
		AA	RVSQDINSYLN	SASNLQS	QRTYNALPT
			(SEQ ID NO: 164)	(SEQ ID NO: 165)	(SEQ ID NO: 166)
iPS:480573	9D3.1_L C2	NA	AGGGCCAGTCAGACTATTAGC AGCAGCTACTTAGCC	GGTGCATCCAACAGGGTCATT	CAGCAGTATGGTAACTCACCC ATGTGCAGT
			(SEQ ID NO: 167)	(SEQ ID NO: 168)	(SEQ ID NO: 169)
		AA	RASQTISSSYLA	GASNRVI	QQYGNSPMCS
			(SEQ ID NO: 170)	(SEQ ID NO: 171)	(SEQ ID NO: 172)
iPS:481500	6C9.1	NA	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGG AGCAACTTAGCC	GGTGCATCCACCAGGGCCACT	CAGCAGTATAATAACTGGCCT ACT
			(SEQ ID NO: 173)	(SEQ ID NO: 174)	(SEQ ID NO: 175)
		AA	RASQSVRSNLA	GASTRAT	QQYNNWPT
			(SEQ ID NO: 176)	(SEQ ID NO: 177)	(SEQ ID NO: 178)
iPS:481501	4E2.1	NA	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGG AGCAACTTAGCC	GGTGCATCCACCAGGGCCACT	CAGCAGTATAATAATTGGCCT ACT
			(SEQ ID NO: 179)	(SEQ ID NO: 180)	(SEQ ID NO: 181)
		AA	RASQSVRSNLA	GASTRAT	QQYNNWPT
			(SEQ ID NO: 182)	(SEQ ID NO: 183)	(SEQ ID NO: 184)

iPS:481983	3D5.1	NA	CGGGCAAGTCAGGACATTAG AAATGATTTAGGC	GTTGCATCCAGTTTGCAAAGT	CTACAGCATAATATTTACCCG TGCAGT
			(SEQ ID NO: 185)	(SEQ ID NO: 186)	(SEQ ID NO: 187)
		AA	RASQDIRNDLG	VASSLQS	LQHNIYPCS
			(SEQ ID NO: 188)	(SEQ ID NO: 189)	(SEQ ID NO: 190)

iPS:481984	5D11.1	NA	CAAGGAGACAGCCTCAGAAC CTATTATGCAAGC	GGTAAAAACATCCGGCCCTCA	AACTCCCGGGACAGCAGTGGT GACCATGTGATA
			(SEQ ID NO: 191)	(SEQ ID NO: 192)	(SEQ ID NO: 193)
		AA	QGDSLRTYYAS	GKNIRPS	NSRDSSGDHVI
			(SEQ ID NO: 194)	(SEQ ID NO: 195)	(SEQ ID NO: 196)
iPS:481989	1H1.1	NA	ACCCGCAGCAGTGGCAGCATT GTCAGCAACTATGTGCAG	GAGGATAATCAAAGACCCTCT	CAGTCTTATGATAGCAGCAAT CAGGTG
			(SEQ ID NO: 197)	(SEQ ID NO: 198)	(SEQ ID NO: 199)
		AA	TRSSGSIVSNYVQ	EDNQRPS	QSYDSSNQV
			(SEQ ID NO: 200)	(SEQ ID NO: 201)	(SEQ ID NO: 202)
iPS:480570	9E8.1	NA	TCTGGAAGCAGCTCCAACATC GGAAGTAATTATGTATTC	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA	GCAGCATGGGATGACAGCCTG AGTGGTTGGGTG
			(SEQ ID NO: 203)	(SEQ ID NO: 204)	(SEQ ID NO: 205)
		AA	SGSSSNIGSNYVF	RNNQRPS	AAWDDSLSGWV
			(SEQ ID NO: 206)	(SEQ ID NO: 207)	(SEQ ID NO: 208)
iPS:480538	2B6.1	NA	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGA AGCAACTTAGCC	GGTGCATCCACCAGGGCCACT	CAGCAATACACTGACTGGCCC ACT
			(SEQ ID NO: 209)	(SEQ ID NO: 210)	(SEQ ID NO: 211)
		AA	RASQSVRSNLA	GASTRAT	QQYTDWPT
			(SEQ ID NO: 212)	(SEQ ID NO: 213)	(SEQ ID NO: 214)
iPS:480569	1D2.1	NA	AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTA CATAGTCATGGATACAGCTAT TTGAAT	TTGGGTTCTAATCGGGCCTCC	ATGCAAGTTCTGCTAACTCCG ATCACC
			(SEQ ID NO: 215)	(SEQ ID NO: 216)	(SEQ ID NO: 217)
		AA	RSSQSLLHSHGYSYLN	LGSNRAS	MQVLLTPIT
			(SEQ ID NO: 218)	(SEQ ID NO: 219)	(SEQ ID NO: 220)

Таблица 4В. Иллюстративные нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3

Идентификационный №	Антитело	Тип	CDRH1	CDRH2	CDRH3
iPS:480496	17B3.1	NA	AGTTATGGCATGCAC	GTTATATGGTATGATGGAAGT AATGAATACTATGCAGACTCC GTGAAGGGC	CATGACCACAGTCACTACGGT TTTGACTAC
			(SEQ ID NO: 221)	(SEQ ID NO: 222)	(SEQ ID NO: 223)
		AA	SYGMH	VIWYDGSNEYADSVKG	HDHSHYGFDY
			(SEQ ID NO: 224)	(SEQ ID NO: 225)	(SEQ ID NO: 226)
iPS:480499	15D11.1	NA	AATGCTGAAATGGGTGTGAGC	CACCTTTTTTCGAATGACGAA AAATCCTACAGCACATCTCTG AAGAGC	TCGTTTAACTGGAACACGAC TTTGACTAC
			(SEQ ID NO: 227)	(SEQ ID NO: 228)	(SEQ ID NO: 229)
		AA	NAEMGVS	HLFSNDEKSYSTSLKS	SFNWNYDFDY
			(SEQ ID NO: 230)	(SEQ ID NO: 231)	(SEQ ID NO: 232)
iPS:480522	4F5.1	NA	AGTGGTAGTTACTACTGGGGC	AGTATCTATTATGGTGGGAAC ACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGT	GAAGTGCAGAGGGCTTTTGAT ATC
			(SEQ ID NO: 233)	(SEQ ID NO: 234)	(SEQ ID NO: 235)
		AA	SGSYYWG	SIYYGGNTYYNPSLKS	ELRRAFDI
			(SEQ ID NO: 236)	(SEQ ID NO: 237)	(SEQ ID NO: 238)

iPS:481499	1A12.1	NA	TACTATGGCATGCAC	GTTATATGGTATGATGGAAGT AATAAATACTATGCAGACTCC GTGAAGGGC	GATCATGACTACGGTGTCTG TACTACTTTGACTAC
			(SEQ ID NO: 239)	(SEQ ID NO: 240)	(SEQ ID NO: 241)
		AA	YYGMH	VIWYDGSNKYYADSVKG	DHDYGVLYYFDY
			(SEQ ID NO: 242)	(SEQ ID NO: 243)	(SEQ ID NO: 244)
iPS:480526	6B1.1	NA	ACTAGTGGAGTGGGTGTGGGC	CTCATTTATTGGAATGATGAT AAGCGCTACAGCCCATCTCTG AAGAGC	AGACATGGCTACGATAGGATG CGTGATGCTTTTGATATC
			(SEQ ID NO: 245)	(SEQ ID NO: 246)	(SEQ ID NO: 247)
		AA	TSGVGVG	LIYWND DKRYSPSLKS	RHGYDRMRDAFDI
			(SEQ ID NO: 248)	(SEQ ID NO: 249)	(SEQ ID NO: 250)
iPS:480529	1G9.1	NA	AGCTACTTTATACAC	ATAATCAACCCTAGTGGTGGT AGCACAAGCTACGCACAGAA GTTCCAGGGC	GATCAGGAGGGAGCAGTGGC TGGTACAGACTACTACTTCTA CGGTATGGACGTC
			(SEQ ID NO: 251)	(SEQ ID NO: 252)	(SEQ ID NO: 253)
		AA	SYFIH	IINPSGGSTSYAQKFQG	DQEGAVAGTDYYFYGMDV
			(SEQ ID NO: 254)	(SEQ ID NO: 255)	(SEQ ID NO: 256)
iPS:480533	6E12.1	NA	AGCTATGGCATGCAC	GTTATATCATATGATGGAAAT AATAAATACTATGCAGACTCC GTGAAGGGC	GATGCCAGTGGGAGCTCCCTC TACCTTGACTAC
			(SEQ ID NO: 257)	(SEQ ID NO: 258)	(SEQ ID NO: 259)
		AA	SYGMH	VISYDGNNKYYADSVKG	DASGSSLYLDY
			(SEQ ID NO: 260)	(SEQ ID NO: 261)	(SEQ ID NO: 262)
iPS:480548	9G5.1	NA	AACTATGGCATGCAC	GTTATATCATATGATGGAAGT AAAAAATACTATGCAGACTCC GTGAAGGGC	GATGCCAGTGGGAGCTCCCTC TACTCTGACTAC
			(SEQ ID NO: 263)	(SEQ ID NO: 264)	(SEQ ID NO: 265)
		AA	NYGMH	VISYDGSKKYYADSVKG	DASGSSLYSDY
			(SEQ ID NO: 266)	(SEQ ID NO: 267)	(SEQ ID NO: 268)

iPS:480551	5A12.1	NA	AGCTATGGCATGCAC	GTTATATCAAAAGATGGAAGT TATAAATACTATGCGGACTCC GTGAAGGGC	GATGCCAGTGGGAGCTCCCTC TACTTAGACTAC
			(SEQ ID NO: 269)	(SEQ ID NO: 270)	(SEQ ID NO: 271)
		AA	SYGMH	VISKDGSYKYYADSVKG	DASGSSLYLDY
			(SEQ ID NO: 272)	(SEQ ID NO: 273)	(SEQ ID NO: 274)
iPS:480555	6B11.1	NA	AGCTATGGCATGCAC	GTTATATGGTATGATGGAAGT AATAAATAACCATGCAGACTCC GTGAAGGGC	GACTTTGCTTACTTCTACTACG GTATGGACGTC
			(SEQ ID NO: 275)	(SEQ ID NO: 276)	(SEQ ID NO: 277)
		AA	SYGMH	VIWYDGSNKYHADSVKG	DFAYFYYGMDV
			(SEQ ID NO: 278)	(SEQ ID NO: 279)	(SEQ ID NO: 280)
iPS:480558	8C8.1	NA	ACTAGTGGAGTGGGTGTGGGC	CTCATTTATTGGAATGATGAT AAGCGCTACAGCCCATCTCTG AAGAGC	AGACATGGCTACGATAGGATG CGTGATGCTTTTGATATC
			(SEQ ID NO: 281)	(SEQ ID NO: 282)	(SEQ ID NO: 283)
		AA	TSGVGVG	LIYWND DKRYSPSLKS	RHGYDRMRDAFDI
			(SEQ ID NO: 284)	(SEQ ID NO: 285)	(SEQ ID NO: 286)
iPS:480561	8G12.1	NA	AGTGGTGGTTACTACTGGAGC	TACATCTCTTACAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGT	GAGAGCCCTACGGTGACTACG GCTTTTGATATC
			(SEQ ID NO: 287)	(SEQ ID NO: 288)	(SEQ ID NO: 289)
		AA	SGGYYS	YISYSGSTYYNPSLKS	ESPTVTTAFDI
			(SEQ ID NO: 290)	(SEQ ID NO: 291)	(SEQ ID NO: 292)

iPS:480572	9D3.1_L C1	NA	AGTGGTGGTTACGACTGGAGC	AACATTTATTACAGTGGGAGG ACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGT	GATCGCCCTTATGGAGGTAAT TCCGGCTACTACTACGGTATG GACGTC
			(SEQ ID NO: 293)	(SEQ ID NO: 294)	(SEQ ID NO: 295)
		AA	SGGYDWS	NIYYSGRTYYNPSLKS	DRPYGGNSGYYYGMDV
			(SEQ ID NO: 296)	(SEQ ID NO: 297)	(SEQ ID NO: 298)
iPS:480573	9D3.1_L C2	NA	AGTGGTGGTTACGACTGGAGC	AACATTTATTACAGTGGGAGG ACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGT	GATCGCCCTTATGGAGGTAAT TCCGGCTACTACTACGGTATG GACGTC
			(SEQ ID NO: 299)	(SEQ ID NO: 300)	(SEQ ID NO: 301)
		AA	SGGYDWS	NIYYSGRTYYNPSLKS	DRPYGGNSGYYYGMDV
			(SEQ ID NO: 302)	(SEQ ID NO: 303)	(SEQ ID NO: 304)
iPS:481500	6C9.1	NA	AGTAGTAGTTACTATTGGGGC	AGTATCTATTATGGTGGGAAC ACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGT	GAACTGCGGAGGGCTTTTGAT ATC
			(SEQ ID NO: 305)	(SEQ ID NO: 306)	(SEQ ID NO: 307)
		AA	SSSYWYG	SIYYGGNTYYNPSLKS	ELRRAFDI
			(SEQ ID NO: 308)	(SEQ ID NO: 309)	(SEQ ID NO: 310)
iPS:481501	4E2.1	NA	AGTGGTAGTTACTACTGGGGC	AGTATCTATTATGGTGGGAAC ACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGT	GAACTGCGGAGGGCTTTTGAT ATC
			(SEQ ID NO: 311)	(SEQ ID NO: 312)	(SEQ ID NO: 313)
		AA	SGSYWYG	SIYYGGNTYYNPSLKS	ELRRAFDI
			(SEQ ID NO: 314)	(SEQ ID NO: 315)	(SEQ ID NO: 316)

iPS:481983	3D5.1	NA	AGCTTTGGCATGCAC	ATTTTATCATTGATGGAAAT AATAAATACTATGCAGACTCC GTGAAGGGC	GAGGGGGGGTATAACTGGAA CTACGACTTTGACTAC
			(SEQ ID NO: 317)	(SEQ ID NO: 318)	(SEQ ID NO: 319)
		AA	SFGMH	ILSFDGNNKYYADSVKG	EGGYNWNYDFDY
			(SEQ ID NO: 320)	(SEQ ID NO: 321)	(SEQ ID NO: 322)
iPS:481984	5D11.1	NA	AGTGGTGGTGACTACTGGAGC	TATATCTATTACACTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTC AAGAGT	TCGGGTGTAGCAATGGCTCGC TTTGACTAC
			(SEQ ID NO: 323)	(SEQ ID NO: 324)	(SEQ ID NO: 325)
		AA	SGGDYWS	YIYYTGSTNYPNPSLKS	SGVAMARFDY
			(SEQ ID NO: 326)	(SEQ ID NO: 327)	(SEQ ID NO: 328)
iPS:481989	1H1.1	NA	AGTGGTGGCTACCACTGGAGC	TACATCTATTACAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCTC AAGAGT	GAGACTACGGTGGTAAAGGG GTACTTCGATCTC
			(SEQ ID NO: 329)	(SEQ ID NO: 330)	(SEQ ID NO: 331)
		AA	SGGYHWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ETTVVKGYFDL
			(SEQ ID NO: 332)	(SEQ ID NO: 333)	(SEQ ID NO: 334)
iPS:480570	9E8.1	NA	TACGCCTGGATGGGC	CGTATTAAAAGCAAACTGAT GGTGGGACAACAGACTACGCT GCACCCGTGAAAGGC	GATGGGGCACTGGCCCCCAC GGCTAC
			(SEQ ID NO: 335)	(SEQ ID NO: 336)	(SEQ ID NO: 337)
		AA	YAWMG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	DGALAPHGY
			(SEQ ID NO: 338)	(SEQ ID NO: 339)	(SEQ ID NO: 340)

iPS:480538	2B6.1	NA	AGTGGTGGTTACTTCTGGAGC	TACATCTATTACAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCCTC AAGAGT	TGGGGAGCAGCAGCCGGCTTT GACTAT
			(SEQ ID NO: 341)	(SEQ ID NO: 342)	(SEQ ID NO: 343)
		AA	SGGYFWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	WGAAAGFDY
			(SEQ ID NO: 344)	(SEQ ID NO: 345)	(SEQ ID NO: 346)
iPS:480569	1D2.1	NA	AGCTATGGCATGCAC	GTTATATCATATGATGGAAAT AATAAATACTATGCAGACTCC GTGAAGGGC	GATGCCAGTGGGAGCTCCCTC TACCTTGACTAC
			(SEQ ID NO: 347)	(SEQ ID NO: 348)	(SEQ ID NO: 349)
		AA	SYGMH	VISYDGNKYYADSVKG	DASGSSLYLDY
			(SEQ ID NO: 350)	(SEQ ID NO: 351)	(SEQ ID NO: 352)

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 331, 335, 339, 343, 347, и 351. В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 268, 272, 276, 280, 284, 288, 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336, 340, 344, 348 и 352. В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 331, 335, 339, 343, 347 и 351, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 268, 272, 276, 280, 284, 288, 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336, 340, 344, 348 и 352. В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат комбинацию переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 267, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 268; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 271, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 272; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 275, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 276; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 279, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 280; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 283, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 284; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 287, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 288; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 291, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 292; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 295, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 296; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 299, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 300; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 303, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 304; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 307, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 308; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 311, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 312; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 315, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 316; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 319, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 320; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 323, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 324; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 327, и

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 328; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 331, и вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 332; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 335, и вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 336; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 339, и вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 340; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 343, и вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 344; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 347, и вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 348; и вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 351, и вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 352.

[157] В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 265, 269, 273, 277, 281, 285, 289, 293, 297, 301, 305, 309, 313, 317, 321, 325, 329, 333, 337, 341, 345 и 349. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 266, 270, 274, 278, 282, 286, 290, 294, 298, 302, 306, 310, 314, 318, 322, 326, 330, 334, 338, 342, 346 и 350. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 265, 269, 273, 277, 281, 285, 289, 293, 297, 301, 305, 309, 313, 317, 321, 325, 329, 333, 337, 341, 345 и 349, и вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 266, 270, 274, 278, 282, 286, 290, 294, 298, 302, 306, 310, 314, 318, 322, 326, 330, 334, 338, 342, 346 и 350. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат комбинацию вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из вариабельной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 265, и вариабельной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 266; вариабельной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 269, и вариабельной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 270; вариабельной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 273, и вариабельной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 274; вариабельной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 277, и вариабельной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 278; вариабельной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 281, и

[illegible]

последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 334; вариательной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 337, и вариательной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 338; вариательной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 341, и вариательной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 342; вариательной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 345, и вариательной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 346; и вариательной области легкой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 349, и вариательной области тяжелой цепи, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 350.

[158] Некоторые антиген–связывающие белки содержат вариательный домен легкой цепи и вариательный домен тяжелой цепи, как указано в одном из строк для одного из антител, перечисленных в таблице 3. В некоторых случаях антиген–связывающий белок содержит два идентичных вариательных домена легкой цепи и два идентичных вариательных домена тяжелой цепи от одного из антител, перечисленных в таблице 3. Некоторые предусмотренные антиген–связывающие белки содержат вариательный домен легкой цепи и вариательный домен тяжелой цепи, как перечислено в одной из строк для одного из антител, перечисленных в таблице 3, за исключением того, что один или оба домена отличаются от последовательности, указанной в таблице только по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотным остаткам, где каждое такое отличие последовательности независимо представляет собой единичную аминокислотную делецию, вставку или замену, при этом делеции, вставки и/или замены приводят к не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотным изменениям относительно последовательностей вариательного домена, указанных в таблице 3. В одном варианте осуществления антиген–связывающий белок содержит последовательность вариательной области из таблицы 3, но с удаленным N–концевым метионином. Другие антиген–связывающие белки также содержат вариательный домен легкой цепи и вариательный домен тяжелой цепи, как указано в одной из строк для одного из антител, перечисленных в таблице 3, за исключением того, что один или оба домена отличаются от последовательности, указанной в таблице, тем, что вариательный домен тяжелой цепи и/или вариательный домен легкой цепи содержат или состоят из последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотными последовательностями вариательного домена тяжелой цепи или с последовательностями вариательного домена легкой цепи, как указано в таблице 3.

[159] В другом аспекте антиген–связывающий белок состоит только из вариательного домена легкой цепи или вариательного домена тяжелой цепи из антитела,

указанного в таблице 3. В еще одном аспекте антиген–связывающий белок содержит два или более одинаковых переменных доменов тяжелой цепи или два или более одинаковых переменных доменов легкой цепи, из тех, которые перечислены в таблице 3. Такие доменные антитела могут быть слиты или соединены через линкер, как описано более подробно ниже. Доменные антитела также могут быть слиты или соединены с одной или несколькими молекулами, чтобы продлить период полужизни (например, PEG или альбумин).

[160] Другие предусмотренные антиген–связывающие белки представляют собой варианты антител, образованных комбинацией тяжелой и легкой цепей, показанных в таблице 3, и содержат легкую и/или тяжелую цепи, каждая из которых имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотными последовательностями таких цепей. В некоторых случаях такие антитела включают по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, тогда как в других случаях варианты формы содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи.

[161] Различные комбинации переменных областей тяжелой цепи могут быть объединены с любой из различных комбинаций переменных областей легкой цепи.

[162] В дополнительном варианте осуществления выделенный антиген–связывающий белок, предусмотренный в данном документе, представляет собой антитело человека, содержащее последовательность, как указано в таблице 3, и относится к типу IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄.

[163] Антиген–связывающие белки, раскрытые в данном документе, представляют собой полипептиды, в которые привиты, вставлены и/или присоединены одна или несколько CDR. Антиген–связывающий белок может иметь 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR. Таким образом антиген–связывающий белок может иметь, например, одну CDR1 тяжелой цепи ("CDRH1"), и/или одну CDR2 тяжелой цепи ("CDRH2"), и/или одну CDR3 тяжелой цепи ("CDRH3"), и/или одну CDR1 легкой цепи ("CDRL1"), и/или одну CDR2 легкой цепи ("CDRL2"), и/или одну CDR3 легкой цепи ("CDRL3"). Некоторые антиген–связывающие белки включают в себя как CDRH3, так и CDRL3. Конкретные CDR легкой и тяжелой цепей указаны в таблицах 4A и 4B, соответственно.

[164] Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) данного антитела могут быть идентифицированы применяя систему, описанную Kabat et al. in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91–3242, 1991. Определенные антитела, которые раскрыты в данном документе, содержат одну или несколько аминокислотных последовательностей, которые идентичны или имеют существенную идентичность последовательности с аминокислотными последовательностями одной или нескольких CDR, представленных в таблицах 4A и 4B. Данные CDR используют систему, описанную Kabat et al. как указано выше.

[165] Структура и свойства CDR в пределах встречающегося в природе антитела

были описаны выше. Кратко, в обычном антителе CDR вставлены в каркас вариабельной области тяжелой и легкой цепей, где они формируют области, ответственные за связывание и распознавание антигена. Вариабельная область содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи, см. выше (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 области каркаса (обозначенные каркасные области 1–4, FR1, FR2, FR3 и FR4, по Kabat et al., 1991, выше; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше). Однако CDR, предложенные в данном документе, могут не только применяться для определения антиген–связывающего домена структуры обычного антитела, но могут быть включены в множество других полипептидных структур, как описано в данном документе.

[166] В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL1, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124 и 130. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL2, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125 и 131. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL3, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126 и 132. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRH1, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256 и 262. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRH2, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 137, 143, 149, 155, 161, 167, 173, 179, 185, 191, 197, 203, 209, 215, 221, 227, 233, 239, 245, 251, 257 и 263. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRH3, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258 и 264. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где каждая CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 и SEQ ID NO: 144; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 150; SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 и SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162; SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168; SEQ

ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 174; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 180; SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 и SEQ ID NO: 186; SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191 и SEQ ID NO: 192; SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 210; SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215 и SEQ ID NO: 216; SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 и SEQ ID NO: 222; SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227 и SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 и SEQ ID NO: 234; SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239 и SEQ ID NO: 240; SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245 и SEQ ID NO: 246; SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 и SEQ ID NO: 252; SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257 и SEQ ID NO: 258; и SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 263 и SEQ ID NO: 264.

[167] В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, кодируемые полинуклеотидом. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL1, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121 и 127. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL2, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122 и 128. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL3, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123 и 129. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRH1, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 133, 139, 145, 151, 157, 163, 169, 175, 181, 187, 193, 199, 205, 211, 217, 223, 229, 235, 241, 247, 253 и 259. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRH2, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254 и 260. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRH3, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 135, 141, 147, 153, 159, 165, 171, 177, 183, 189, 195, 201, 207, 213, 219, 225, 231, 237, 243, 249, 255 и 261. В одном варианте

осуществления антитело или его фрагмент содержат CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где каждая CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно кодируется последовательностью, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134 и SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 141; SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 153; SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159; SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164 и SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176 и SEQ ID NO: 177; SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182 и SEQ ID NO: 183; SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 189; SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 и SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201; SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 207; SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 212 и SEQ ID NO: 213; SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219; SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 224 и SEQ ID NO: 225; SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230 и SEQ ID NO: 231; SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236 и SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242 и SEQ ID NO: 243; SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 и SEQ ID NO: 249; SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254 и SEQ ID NO: 255; и SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 260 и SEQ ID NO: 261.

[168] В другом аспекте антиген-связывающий белок включает 1, 2, 3, 4, 5 или 6 вариантных форм CDR, перечисленных в таблицах 4А и 4В, каждая из которых имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью CDR, приведенной в таблицах 4А и 4В. Некоторые антиген-связывающие белки включают 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR, перечисленных в таблицах 4А и 4В, каждая из которых или все вместе отличаются на не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот от CDR, перечисленных в данной таблице.

[169] В различных других вариантах осуществления антиген-связывающий белок получают из таких антител. Например, в одном аспекте антиген-связывающий белок содержит 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR, перечисленные в одной из строк для любого конкретного антитела, приведенного в таблицах 4А и 4В. В другом аспекте антиген-

связывающий белок включает 1, 2, 3, 4, 5 или 6 вариантных форм CDR, перечисленных в одной из строк для антитела в таблицах 4А и 4В, при этом каждая CDR имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью CDR, приведенной в таблицах 4А и 4В. Некоторые антиген-связывающие белки включают 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR, перечисленных в одной из строк таблиц 4А и 4В, каждая из которых отличается на не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот от перечисленных в данных таблицах CDR. В другом аспекте антиген-связывающий белок содержит все 6 CDR, перечисленных в строке таблиц 4А и 4В, и общее количество аминокислотных замен в CDR в совокупности составляет не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

[170] В еще одном аспекте антиген-связывающие белки, содержащие CDR и/или переменные домены, перечисленные в таблицах 3, 4А и 4В, представляют собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, антитело человека, полиспецифическое антитело или фрагмент антитела вышеизложенного. В другом варианте осуществления фрагмент антитела выделенных антиген-связывающих белков, предусмотренных в данном документе, представляет собой Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело или scFv на основе антитела с последовательностями, перечисленными в таблицах 3, 4А и 4В.

[171] В еще одном аспекте выделенный антиген-связывающий белок, представленный в таблицах 3, 4А и 4В, может быть соединен с группой мечения и может конкурировать за связывание с Jagged1 с антиген-связывающим белком, выбранным из одного из выделенных антиген-связывающих белков, предусмотренных в данном документе.

[172] В другом варианте осуществления предусмотрены антиген-связывающие белки, которые конкурируют с одним из иллюстративных антител или функциональных фрагментов, описанных выше, за специфическое связывание с Jagged1 человека (например, SEQ ID NO: 353). Такие антиген-связывающие белки могут связываться с тем же эпитопом, что и один из описанных в данном документе антиген-связывающих белков, или с перекрывающимся эпитопом. Ожидается, что антиген-связывающие белки и фрагменты, которые конкурируют с иллюстративными антиген-связывающими белками, будут показывать сходные функциональные свойства. Иллюстративные антиген-связывающие белки и фрагменты включают описанные выше, в том числе содержащие домены переменной области и CDR, включенные в таблицы 3, 4А и 4В. Таким образом, в качестве конкретного примера, предложенные антиген-связывающие белки включают в себя те, которые конкурируют с антителом, имеющим:

[173] все 6 CDR, перечисленных для любого антитела, представленного в таблицах 4А и 4В; или

[174] VH и VL, перечисленные для любого антитела, представленного в таблице 3.

[175] Предусмотренные антиген-связывающие белки включают моноклональные антитела, которые связываются с Jagged1. Моноклональные антитела могут быть

получены с применением любой методики, известной из уровня техники, например, путем иммортализации клеток селезенки, собранных из трансгенного животного после завершения плана иммунизации. Клетки селезенки могут быть иммортализованы с применением любой методики, известной из уровня техники, например, путем их слияния с клетками миеломы для получения гибридом. Клетки миеломы для применения в гибридома-продуцирующих способах гибридизации, предпочтительно представляют собой клетки которые не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью гибридизации, и имеют нехватку ферментов, которые делают их неспособными расти в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только желаемых гибридных клеток (гибридомы). Примеры подходящих линий клеток для применения в гибридизации мышей 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 линий клеток, применяемых в гибридизации крыс, включают R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210. Другие линии клеток, применяемые для гибридизации клеток, представляют собой U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

[176] В некоторых случаях линию клеток гибридомы получают посредством иммунизации животного (например, трансгенного животного, имеющего последовательности иммуноглобулина человека) иммуногеном Jagged1; сбора клеток селезенки у иммунизированного животного; гибридизации собранных клеток селезенки с линией клеток миеломы, за счет чего обеспечивается получение клеток гибридомы; образования линий клеток гибридомы из клеток гибридомы и определения линии клеток гибридомы, которая продуцирует антитело, которое связывает полипептид Jagged1. Такие линии клеток гибридомы и моноклональные антитела к Jagged1, продуцируемые ими, представляют собой аспекты настоящей заявки.

[177] Моноклональные антитела, секретируемые линией клеток гибридомы, могут быть очищены с применением любой методики, известной из уровня техники. Гибридомы или mAb могут быть дополнительно подвергнуты скринингу для идентификации mAb с определенными свойствами, такими как способность увеличивать активность Jagged1.

[178] Также предложены химерные и гуманизированные антитела, на основе вышеуказанных последовательностей. Моноклональные антитела для применения в качестве терапевтических средств могут быть модифицированы различными способами перед применением. Одним из примеров является химерное антитело, которое представляет собой антитело, состоящее из сегментов белка из различных антител, которые ковалентно соединены для получения функциональных легких или тяжелых цепей иммуноглобулина или их иммунологически функциональных частей. В целом, как правило, часть тяжелой цепи и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антитела, тогда как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или

подклассу антитела. Для способов, относящихся к химерным антителам, см., например, патент США № 4816567; и Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–6855, которые включены в данный документ посредством ссылки. Прививание CDR описано, например, в патенте США № 6180370, № 5693762, № 5693761, № 5585089 и № 5530101.

[179] Как правило, целью получения химерного антитела является создание химерной конструкции, в которой количество аминокислот из вида предполагаемых пациентов является максимальным. Одним из примеров является "CDR–привитое" антитело, в котором антитело содержит одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR), из конкретного вида или принадлежащих определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(–ей) антитела является идентичной или гомологичной соответствующей последовательности в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител. В случае применения на людях вариабельную область или выбранные CDR из антитела грызунов зачастую прививают в антитело человека, заменяя встречающиеся в природе вариабельные области или CDR антитела человека.

[180] Одним из применимых типов химерных антител является "гуманизированное" антитело. Как правило, гуманизированное антитело получают из моноклонального антитела, первоначально происходящего из животного, не являющегося человеком. Некоторые аминокислотные остатки в данном моноклональном антителе, как правило, из участков антитела, которые не распознают антиген, модифицируют так, чтобы они были гомологичными соответствующим остаткам в антителе человека соответствующего изотипа. Гуманизация может проводиться, например, с применением различных способов посредством замены по меньшей мере части вариабельной области грызуна на соответствующие области антитела человека (см., например, патент США № 5585089 и № 5693762; Jones et al., 1986, Nature 321:522–525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323–27; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534–1536).

[181] В одном аспекте CDR вариабельных областей легкой и тяжелой цепи антител, предусмотренных в данном документе, прививают в каркасные области (FR) из антител одного или различных филогенетических видов. Например, CDR вариабельных областей тяжелой и легкой 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 и/или V_L1 и V_L2 могут быть привиты в консенсусные FR человека. Для создания консенсусных FR человека, FR из нескольких аминокислотных последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи человека могут быть выровнены для идентификации консенсусной аминокислотной последовательности. В других вариантах осуществления FR тяжелой цепи или легкой цепи, раскрытые в данном документе, заменяют на FR из другой тяжелой цепи или легкой цепи. В одном аспекте редкие аминокислоты в FR тяжелой и легкой цепей антител к Jagged1 не заменены, в то время как остальные аминокислоты FR заменены. "Редкая аминокислота" представляет собой специфическую аминокислоту, которая находится в положении, в котором данная определенная аминокислота обычно не встречается в FR. В качестве альтернативы привитые

вариабельные области из одной тяжелой или легкой цепи могут применяться с константной областью, которая отличается от константной области определенной тяжелой или легкой цепи, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления привитые вариабельные области являются частью одноцепочечного антитела Fv.

[182] В некоторых вариантах осуществления константные области из отличного от человека вида могут применяться наряду с вариабельной областью(ями) человека для получения гибридных антител.

[183] Также предусмотрены полностью человеческие антитела к Jagged1. Доступны способы получения полностью человеческих антител, специфических в отношении данного антигена, без воздействия антигена на человека ("полностью человеческое антитело"). Одним конкретным способом, предусмотренным для осуществления получения полностью человеческих антител, является "гуманизация" мышиной гуморальной иммунной системы. Внесение иммуноглобулиновых локусов человека (Ig) в геном мышей, у которых были инактивированы эндогенные гены Ig, является одним из способов получения полностью человеческих моноклональных антител (mAb) в мышце, животном, которое можно иммунизировать любым желаемым антигеном. Применение полностью человеческих антител может минимизировать иммуногенные и аллергические реакции, которые иногда могут быть вызваны введением людям в качестве мышинных терапевтических средств или полученных с помощью мыши mAb.

[184] Полностью человеческие антитела могут быть получены посредством иммунизации трансгенных животных (обычно мышей), которые способны продуцировать репертуар человеческих антител при отсутствии продукции эндогенного иммуноглобулина. Применяемые для этой цели антигены, как правило, содержат шесть или более смежных 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 путем нейтрализации эндогенных иммуноглобулиновых локусов мыши, кодирующих тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина мыши, и вставки в мышиный геном больших фрагментов геномной ДНК человека, содержащей локусы, которые кодируют белки тяжелых и легких цепей человека. Затем частично модифицированных животных, которые имеют неполный набор локусов иммуноглобулинов человека, подвергают кроссбридингу с целью получения животного, обладающего всеми желаемыми модификациями иммунной системы. После введения иммуногена эти трансгенные животные продуцируют антитела, которые являются иммуноспецифическими к данному иммуногену, но имеют скорее человеческие, а не мышинные аминокислотные последовательности, в том числе вариабельные области. Для дополнительной информации по таким способам см., например WO96/33735 и WO94/02602. Дополнительные способы, относящиеся к применению трансгенных мышей для получения антител человека, описаны в патенте США № 5545807; № 6713610; № 6673986; № 6162963; № 5545807; № 6300129; №

6255458; № 5877397; № 5874299 и № 5545806; в публикациях согласно PCT WO91/10741, WO90/04036 и в EP 546073B1 и EP 546073A1.

[185] Описанные выше трансгенные мыши, обозначенные в данном документе как мыши "HuMab", содержат минилокус гена иммуноглобулина человека, который кодирует неперестроенные последовательности тяжелых ([мю] и [гамма]) и легкой [каппа] цепей иммуноглобулина человека наряду с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы [мю] и [каппа] цепей (Lonberg et al., 1994, *Nature* 368:856–859). Соответственно, данные мыши проявляют сниженную экспрессию мышинных IgM или [каппа], и в ответ на иммунизацию, введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека претерпевают переключение класса и соматическую мутацию с образованием высокоаффинных моноклональных антител IgG [каппа] человека (Lonberg et al., выше.; 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 описано подробно в Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research* 20:6287–6295; Chen et al., 1993, *International Immunology* 5:647–656; Tuailon 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; указанные выше ссылки включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей. См. дополнительно патент 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 включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Технологии, применяемые для получения антител человека в этих трансгенных мышах, описаны также в WO 98/24893 и Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146–156, которые включены в данный документ посредством ссылки. Например, трансгенные линии мышей HCo7 и HCo12 могут использоваться для получения человеческих моноклональных антител к Jagged1. Дополнительные детали, касающиеся производства человеческих антител с применением трансгенных мышей, приведены ниже.

[186] Применяя гибридную технологию, из трансгенных мышей, таких как описанные выше мыши, можно получить и отобрать антиген-специфические mAb человека с желаемой специфичностью. Такие антитела могут быть клонированы и экспрессированы с применением подходящего вектора и клетки-хозяина, или данные антитела можно собрать из культивируемых гибридных клеток.

[187] Полностью человеческие антитела также могут быть получены из библиотек фагового дисплея (как раскрыто в Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; и Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). Методики фагового дисплея имитируют иммунную селекцию посредством отображения репертуаров антител на поверхности нитевидного бактериофага и последующей селекции фага посредством их связывания с выбранным

антигеном. Одна из таких методик описана в публикации согласно РСТ № WO 99/10494 (включенной в данный документ посредством ссылки).

[188] Связывающий белок, взаимодействующий с Jagged1, также может быть вариантом, миметиком, производным или олигомером на основе структуры белков, связывающих антиген Jagged1, имеющих CDR, переменные области и/или полноразмерные цепи, как описано выше.

[189] В одном варианте осуществления, для примера, антиген–связывающий белок представляет собой вариантную форму раскрытых выше антиген–связывающих белков. Например, некоторые из антиген–связывающих белков имеют одну или несколько консервативных аминокислотных замен в одной или нескольких из тяжелых или легких цепей, переменных областей или CDR.

[190] Встречающиеся в природе аминокислоты можно подразделить на классы на основании общих свойств боковой цепи:

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

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

[193] 3) кислотные: Asp, Glu;

[194] 4) основные: His, Lys, Arg;

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

[196] 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[197] Консервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов другим членом того же класса. Консервативные аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые, как правило, вносят посредством химического пептидного синтеза, а не посредством синтеза в биологических системах. Они включают в себя пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных компонентов.

[198] Неконсервативные замены могут включать замену члена одного из указанных выше классов членом из другого класса. Такие замещенные остатки могут быть внесены в области антитела, которые гомологичны человеческим антителам, или в негомологичные области молекулы.

[199] При осуществлении таких изменений в соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно учитывать индекс гидрофобности аминокислот. Профиль гидрофобности белка рассчитывают посредством присвоения каждой аминокислоте числового значения ("индекс гидрофобности") и затем проведения повторного усреднения этих значений по всей пептидной цепи. Каждой аминокислоте присвоен индекс гидрофобности на основании характеристик ее гидрофобности и заряда. Они составляют: 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); глутамат (–3,5); глутамин (–3,5); аспарат (–3,5); аспарагин (–3,5); лизин (–3,9); и аргинин (–4,5).

[200] Важность профиля гидрофобности в обеспечении биологической функции

взаимодействия на белке в данной области техники является очевидной (см., например, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105–131). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты, обладающие аналогичным индексом или показателем гидрофобности с сохранением аналогичной биологической активности. При внесении изменений, основанных на индексе гидрофобности, в некоторых вариантах осуществления включена замена аминокислот, индексы гидрофобности которых находятся в пределах ± 2 . В некоторых аспектах включены те, которые находятся в пределах ± 1 , а в других аспектах включены те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$.

[201] Также из уровня техники известно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно осуществлена на основании гидрофильности, в частности, если биологически функциональный белок или пептид, созданный таким образом, предполагается применять в иммунологических вариантах осуществления, как в данном случае. В некоторых вариантах осуществления самая высокая локальная средняя гидрофильность белка, которая обусловлена гидрофильностью смежных с ним аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антиген–связывающими свойствами или иммуногенностью, то есть с биологическим свойством данного белка.

[202] Данным аминокислотным остаткам присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (–0,4); пролин (–0,5 $\pm$ 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 внесении изменений, основанных на подобных значениях гидрофильности, в определенных вариантах осуществления включена замена аминокислот, чьи значения гидрофильности находятся в пределах ± 2 , в других вариантах осуществления включены те, которые находятся в пределах ± 1 , и еще в других вариантах осуществления включены те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$. В некоторых случаях на основании гидрофильности также можно идентифицировать эпитопы из первичных аминокислотных последовательностей. Такие области также называют "коровыми областями эпитопа".

[203] Иллюстративные консервативные аминокислотные замены представлены в таблице 5.

Таблица 5. Консервативные аминокислотные замены

Исходные остатки	Иллюстративные замены
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser

Исходные остатки	Иллюстративные замены
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

[204] Для специалиста в данной области техники будет нетрудно определить подходящие варианты приведенных в данном документе полипептидов, используя хорошо известные методики. Специалист в данной области техники может определить подходящие участки молекулы, которые можно изменять, не нарушая при этом ее активность, путем нацеливания на участки, которые не считаются важными для активности молекулы. Специалист в данной области техники также сможет определить остатки и части молекул, которые являются консервативными среди сходных полипептидов. В дополнительных вариантах осуществления консервативным аминокислотным заменам без разрушения биологической активности или без неблагоприятного воздействия на структуру полипептида могут быть подвергнуты даже области, которые могут быть важны для биологической активности или для структуры.

[205] Кроме того, специалист в данной области техники может сделать обзор по исследованиям структурно-функциональных свойств, позволяющим идентифицировать остатки в подобных полипептидах, которые являются важными для активности или структуры. С учетом такого сравнения можно предсказать важность аминокислотных остатков в белке, которые соответствуют аминокислотным остаткам, важным для активности или структуры в подобных белках. Специалист в данной области техники

может сделать выбор химически подобных аминокислотных замен для таких предсказанных важных аминокислотных остатков.

[206] Специалист в данной области техники также может выполнить анализ 3-мерной структуры и аминокислотной последовательности по отношению к этой структуре в подобных полипептидах. С учетом такой информации специалист в данной области техники может предсказать выравнивание аминокислотных остатков антитела, принимая во внимание его трехмерную структуру. Специалист в данной области техники может принять решение не вносить радикальные изменения в аминокислотные остатки, которые предположительно находятся на поверхности белка, так как такие остатки могут участвовать в важных взаимосвязях с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области техники может создавать тестовые варианты, содержащие одну аминокислотную замену в каждом желаемом аминокислотном остатке. Такие варианты затем подвергаются скринингу с применением анализов активности Jagged1, с получением таким образом информации относительно того, какие аминокислоты могут быть изменены и какие не должны быть изменены. Другими словами, на основе информации, собранной из таких стандартных экспериментов, специалист в данной области техники может легко определить положения аминокислот, в которых следует избегать дополнительных замен, либо по отдельности, либо в комбинации с другими мутациями.

[207] Предсказанию вторичной структуры посвящен ряд научных публикаций. См. Moulton, 1996, *Curr. Opin. 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; и Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26:367–384. Кроме того, в настоящее время доступны компьютерные программы, помогающие предсказывать вторичную структуру. Один из способов предсказания вторичной структуры основан на гомологичном моделировании. Например, два полипептида или белка, которые обладают идентичностью последовательности, составляющей более 30% или сходством, составляющим более 40%, могут иметь подобные структурные топологии. Недавний рост базы данных белковых структур (PDB) предоставил расширенные возможности для предсказания вторичной структуры, в том числе предсказания возможного числа вариантов укладки в структуре полипептида или белка. См., Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244–247. Предполагают (Brenner et al., 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369–376), что существует ограниченное число вариантов укладки в данном полипептиде или белке, и что как только критическое число структур будет установлено, структурные предсказания станут значительно более точными.

[208] Дополнительные способы предсказания вторичной структуры включают "протягивание" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377–387; Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15–19), "анализ профиля" (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).

[209] В некоторых вариантах осуществления произведены аминокислотные

замены, которые (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания в отношении образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинности связывания с лигандами или антигенами и/или (4) придают другие физико-химические или функциональные свойства таким полипептидам или модифицируют их. Например, в встречающейся в природе последовательности может быть произведена одна или несколько аминокислотных замен (в некоторых вариантах осуществления консервативные аминокислотные замены). Замены могут быть сделаны в том участке антитела, который лежит за пределами домена (доменов), образующего межмолекулярные контакты. В таких вариантах осуществления могут быть использованы консервативные аминокислотные замены, которые, по сути, не изменяют структурные характеристики исходной последовательности (например, одна или несколько замен аминокислот, 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 *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; и Thornton et al., 1991, *Nature* 354:105, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[210] Дополнительные предпочтительные варианты антител включают цистеиновые варианты, при этом один или несколько остатков цистеина в исходной или нативной аминокислотной последовательности удалены или заменены другой аминокислотой (например, серином). Цистеиновые варианты полезны, в частности, если антитела должны быть подвергнуты рефолдингу в биологически активную конформацию. Цистеиновые варианты могут содержать меньше остатков цистеина, чем нативное антитело, и, как правило, содержат четное количество для сведения к минимуму взаимодействий, обусловленных неспаренными цистеинами.

[211] Тяжелые и легкие цепи, домены вариабельных областей и CDR, которые раскрыты, могут использоваться для получения полипептидов, которые содержат антиген-связывающую область, которая может специфически связываться с Jagged1. Например, одна или несколько CDR могут быть встроены в молекулу (например, полипептид) ковалентно или нековалентно с получением иммуноадгезина. Иммуноадгезин может содержать одну или несколько CDR в виде части более длинной полипептидной цепи, может связывать ковалентной связью CDR с другой полипептидной цепью или может соединять CDR нековалентно. CDR позволяют иммуноадгезину специфически связываться с определенным антигеном, представляющим интерес (например, полипептидом Jagged1 или его эпитопом).

[212] Также предлагаются миметики (например, "пептидные миметики" или "пептидомиметики") на основе доменов вариабельной области и CDR, которые предусмотрены в данном документе. Данные аналоги могут представлять собой пептиды, непептиды или комбинации 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 в данный документ посредством ссылки для любой цели. Пептидные миметики, которые по структуре похожи на терапевтически полезные пептиды, могут быть использованы для получения подобного терапевтического или профилактического эффекта. Такие соединения зачастую разрабатывают с помощью компьютеризированного молекулярного моделирования. Как правило, пептидомиметики представляют собой белки, которые структурно подобны с антителом, проявляющим необходимую биологическую активность, такую как упомянутая в данном документе способность специфически связывать Jagged1, но у которых одна или несколько пептидных связей необязательно заменены связью, выбранной из $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-\text{CH}-$ (цис и транс), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{SO}-$, с помощью способов, хорошо известных из уровня техники. Систематичная замена одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой того же типа (например, D-лизином вместо L-лизина) может быть использована в некоторых вариантах осуществления для создания более стабильных белков. Кроме того, пептиды с ограниченной конформационной свободой, содержащие консенсусную последовательность или, по сути, идентичный вариант консенсусной последовательности, могут быть получены способами, известными из уровня техники (Rizo and Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387), включен в данный документ посредством ссылки), например, посредством добавления внутренних цистеиновых остатков, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют пептид.

[213] Также предлагаются производные антиген-связывающих белков, которые описаны в данном документе. Производные антиген-связывающих белков могут содержать любую молекулу или вещество, которые придают желаемое свойство антителу или фрагменту, такое как увеличенный период полужизни в условиях определенного применения. Производное антиген-связывающего белка может содержать, например, обнаруживаемый (или метящий) фрагмент (например, радиоактивную, колориметрическую, антигенную или ферментную молекулу, обнаруживаемую гранулу (такую как магнитная или электроплотная (например, золото) гранула) 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 улучшает пригодность данного антитела для определенного применения (например, введение субъекту, такому как человек, или для других применений *in vivo* или *in vitro*). Примеры молекул, которые могут быть использованы для получения производных антиген-связывающего белка, включают альбумин (например, сывороточный альбумин человека) и полиэтиленгликоль (PEG). Альбумин-связанные или PEGилированные производные антиген-связывающих белков могут быть получены с помощью методик, хорошо известных из уровня техники. Некоторые антиген-связывающие белки включают в себя пегилированный одноцепочечный полипептид, описанный в данном документе. В

одном варианте осуществления антиген–связывающий белок конъюгирован или иным образом связан с транстиретином (TTR) или вариантом TTR. TTR или вариант TTR может быть химически модифицирован, например, химическим веществом, выбранным из группы, состоящей из декстрана, поли(н–винилпирролидона), полиэтиленгликолей, гомополимеров пропиленгликоля, сополимеров полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированных полиолов и поливиниловых спиртов.

[214] Другие производные включают ковалентные или агрегированные конъюгаты белков, связывающих антиген Jagged1, с другими белками или полипептидами, такими как полученные в результате экспрессии рекомбинантных слитых белков, содержащих гетерологичные полипептиды, слитые с N–концом или C–концом белка, связывающего антиген Jagged1. Например, конъюгированный пептид может представлять собой гетерологичный сигнальный (или лидерный) полипептид, например, лидерный пептид альфа–фактора дрожжей, или такой пептид, как эпитопная метка. Слитые белки, содержащие белок, связывающий антиген Jagged1, могут содержать пептиды, добавленные для облегчения очистки или идентификации белка, связывающего антиген Jagged1 (например, поли–His). Белок, связывающий антиген Jagged1, также может быть связан с пептидом FLAG, как описано в Norp et al., 1988, *Bio/Technology* 6:1204; и патенте США № 5011912. Пептид FLAG обладает высокой антигенностью и обеспечивает обратимое связывание эпитопа специфическим моноклональным антителом (mAb), обеспечивая быстрое проведение анализа и облегчая очистку экспрессируемого рекомбинантного белка. Реагенты, применимые для получения слитых белков, в которых пептид FLAG слит с данным полипептидом, являются коммерчески доступными (Sigma, Сент–Луис, Миссури).

[215] В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок содержит одну или несколько меток. Термин "группа мечения" или "метка" означает любую обнаруживаемую метку. Примеры подходящих групп мечения включают без ограничения радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{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 лантанидов), ферментные группы (например, пероксидазу хрена, β –галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застёжки, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления группу мечения присоединяют к антиген–связывающему белку с помощью спейсерных "ножек" различной длины для уменьшения возможного стерического несоответствия. Из уровня техники известны и могут применяться, если будет сочтено целесообразным, различные способы мечения белков.

[216] Термин "эффекторная группа" означает любую группу, соединенную с антиген–связывающим белком, который выполняет функцию цитотоксического средства. Примерами подходящих эффекторных групп являются радиоизотопы или радионуклиды

(например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I). Другие подходящие группы включают в себя токсины, терапевтические группы или химиотерапевтические группы. Примеры подходящих групп включают в себя калихеамицин, ауристатин, гелданамицин и мейтанзин. В некоторых вариантах осуществления эффекторную группу присоединяют к антиген-связывающему белку с помощью спейсерных "ножек" различной длины для уменьшения возможного стерического несоответствия.

[217] В целом, метки относят к различным классам в зависимости от анализа, в котором их обнаруживают: а) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы; б) магнитные метки (например, магнитные частицы); в) редокс-активные фрагменты; г) оптические красители; ферментные группы (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза); д) биотинилированные группы и е) заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застёжки, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки и т. д.). В некоторых вариантах осуществления группу мечения присоединяют к антиген-связывающему белку с помощью спейсерных "ножек" различной длины для уменьшения возможного стерического несоответствия. Из уровня техники известны различные способы мечения белков.

[218] Специфические метки включают в себя оптические красители, в том числе, не ограничиваясь лишь этими: хромофоры, люминофоры и флуорофоры, при этом последние являются специфическими во многих случаях. Флуорофоры могут представлять собой либо "низкомолекулярные" флуоресцирующие средства, либо белковые флуоресцирующие средства.

[219] Под "флуоресцентной меткой" понимают любую молекулу, которая может быть обнаружена с помощью присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают без ограничения флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, Lucifer Yellow, Cascade Blue J, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, 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 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Юджин, Орегон), FITC, родамин и Texas Red (Pierce, Рокфорд, Иллинойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland, специально включенном в данный документ посредством ссылки.

[220] Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают без ограничения зеленый флуоресцентный белок, включая 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, *Biotechnologies* 24:462–471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178–182), усиленный 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).

[221] Также предлагаются нуклеиновые кислоты, которые кодируют антиген–связывающие белки, описанные в данном документе, или их части, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие одну или обе цепи антитела, или фрагмент, производное, мутеин или их вариант, полинуклеотиды, кодирующие переменные области тяжелой цепи или только CDR, полинуклеотиды, подходящие для применения в качестве гибридизационных зондов, праймеров для ПЦР или праймеров для секвенирования для идентификации, анализа, мутации или амплификации полинуклеотида, кодирующего полипептид, антисмысловые нуклеиновые кислоты для ингибирования экспрессии полинуклеотида и комплементарные последовательности всего приведенного выше. Нуклеиновые кислоты могут быть любой длины. Они могут составлять, например, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1500, 3000, 5000 или более нуклеотидов в длину и/или могут содержать одну или несколько дополнительных последовательностей, например, регуляторных последовательностей, и/или быть частью более длинной нуклеиновой кислоты, например, вектора. Нуклеиновые кислоты могут быть одонитевыми или двухнитевыми и могут содержать нуклеотиды РНК и/или ДНК, а также их искусственные варианты (например, пептидные нуклеиновые кислоты). Любая переменная область, предложенная в данном документе, может быть присоединена к данным константным областям с образованием полных последовательностей тяжелой и легкой цепи. Тем не менее, следует понимать, что данные последовательности константных областей предлагаются только в качестве конкретных примеров. В некоторых вариантах осуществления последовательности переменной области соединяют с другими последовательностями константной области, известными из уровня техники.

[222] Нуклеиновые кислоты, кодирующие некоторые антиген–связывающие белки или их части (например, полноразмерное антитело, тяжелую или легкую цепь, переменный домен или CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3) могут быть выделены из В-клеток мышей, которые были иммунизированы Jagged1 или его иммуногенным фрагментом. Нуклеиновая кислота может быть выделена с помощью традиционных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Фаговый дисплей представляет собой еще один пример известной методики, с помощью которой можно получать производные антител и другие антиген–связывающие белки. В одном из подходов, полипептиды, которые являются компонентами представляющего интерес антиген–связывающего белка, экспрессируют в любой подходящей рекомбинантной экспрессионной системе и делают возможным сворачивание экспрессированных

полипептидов для формирования антиген–связывающих белков.

[223] В одном аспекте дополнительно предложены нуклеиновые кислоты, которые гибридизируются с другими нуклеиновыми кислотами при определенных условиях гибридизации. Способы гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны из уровня техники. См., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1–6.3.6. Как определено в данном документе, в умеренно жестких условиях гибридизации используют раствор для предварительной промывки, содержащий 5х хлорид натрия/цитрат натрия (SSC), 0,5% SDS, 1,0 мМ EDTA (pH 8,0), буфер для гибридизации из приблизительно 50% формамида, 6х SSC и температуру гибридизации, составляющую 55°C (или другие подобные растворы для гибридизации, такие как растворы, содержащие приблизительно 50% формамида, при температуре гибридизации, составляющей 42°C), и условия промывки при 60°C в 0,5х SSC, 0,1% SDS. В жестких условиях гибридизации гибридизацию проводят в 6х SSC при 45°C, с последующей одной или несколькими промывками в 0,1х SSC, 0,2% SDS при 68°C. Кроме того, специалист в данной области техники может управлять условиями гибридизации и/или промывки с целью повышения или снижения жесткости гибридизации таким образом, чтобы нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, которые на по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичны друг другу, как правило, гибридизовались друг с другом.

[224] Основные параметры, влияющие на выбор условий гибридизации, и руководство для разработки подходящих условий приведены, например, в Sambrook, Fritsch, and Maniatis (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., выше; и *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., разделы 2.10 и 6.3–6.4), и могут быть легко определены специалистами обычной квалификации в данной области техники, исходя, например, из длины и/или нуклеотидного состава нуклеиновой кислоты.

[225] Посредством мутаций в нуклеиновую кислоту могут быть внесены изменения, тем самым приводя к изменениям в аминокислотной последовательности полипептида (например, антитела или производного антитела), которую она кодирует. Мутации могут быть внесены применяя любую методику, известную из уровня техники. В одном варианте осуществления один или несколько определенных аминокислотных остатков изменены с помощью, например, протокола сайт–специфического мутагенеза. В другом варианте осуществления один или несколько случайно выбранных остатков изменены с помощью, например, протокола случайного мутагенеза. Независимо от способа выполнения мутантный полипептид может быть экспрессирован и отобран в результате скрининга по желаемому свойству.

[226] Мутации могут быть введены в нуклеиновую кислоту без существенного изменения биологической активности полипептида, который она кодирует. Например, можно выполнить нуклеотидные замены, приводящие к аминокислотным заменам по несущественным аминокислотным остаткам. В качестве альтернативы одна или несколько

мутаций могут быть внесены в нуклеиновую кислоту, что селективно изменяет биологическую активность полипептида, который она кодирует. Например, мутация может количественно или качественно изменять биологическую активность. Примеры количественных изменений включают в себя повышение, снижение или исчезновение активности. Примеры качественных изменений включают в себя изменение антигенной специфичности антитела. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая любой описанный в данном документе антиген–связывающий белок, может быть подвергнута мутации с целью изменения аминокислотной последовательности, применяя методики молекулярной биологии, общепризнанные в данной области техники.

[227] Другой аспект относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые подходят для применения в качестве праймеров или гибридизационных зондов для обнаружения нуклеотидных последовательностей. Молекула нуклеиновой кислоты может содержать только часть нуклеотидной последовательности, кодирующей полноразмерный полипептид, например, фрагмент, который может быть использован в качестве зонда или праймера, или фрагмент, кодирующий активный участок полипептида.

[228] Зонды, основанные на последовательности нуклеиновой кислоты, могут быть использованы для обнаружения нуклеиновой кислоты или подобных нуклеиновых кислот, например, транскриптов, кодирующих полипептид. Зонд может содержать группу мечения, например, радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Такие зонды могут быть использованы для идентификации клетки, которая экспрессирует данный полипептид.

[229] Другой аспект относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или его часть (например, фрагмент, содержащий одну или несколько CDR, или один или несколько доменов варибельной области). Примеры векторов включают без ограничения плазмиды, вирусные векторы, неэписомные векторы млекопитающих и экспрессионные векторы, например, рекомбинантные экспрессионные векторы. Рекомбинантные экспрессионные векторы могут содержать нуклеиновую кислоту в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке–хозяине. Рекомбинантные экспрессионные векторы содержат одну или несколько регуляторных последовательностей, выбранных на основе клеток–хозяев, подлежащих применению для экспрессии, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Регуляторные последовательности включают те, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности в клетках–хозяевах многих типов (например, энхансер ранних генов SV40, промотор вируса саркомы Рауса и промотор цитомегаловируса), те, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в некоторых клетках–хозяевах (например, тканеспецифические регуляторные последовательности, см. Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236:1237, включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме), а также последовательности, которые управляют индуцибельной экспрессией нуклеотидной последовательности в ответ на

определенную обработку или условие (например, металлотиониновый промотор в клетках млекопитающих и tet-чувствительный и/или стрептомицин-чувствительный промотор как в прокариотических, так и в эукариотических системах (см. id.). Специалистам в данной области техники следует принимать во внимание, что конструирование экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровня экспрессии желаемого белка и т.д. Экспрессионные векторы могут быть введены в клетки-хозяева, чтобы тем самым продуцировать белки или пептиды, в том числе гибридные белки или пептиды, кодируемые нуклеиновыми кислотами, как описано в данном документе.

[230] Другой аспект относится к клеткам-хозяевам, в которые введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Клеткой-хозяином может быть любая прокариотическая клетка (например, *E.coli*) или эукариотическая клетка (например, клетки дрожжей, насекомых или млекопитающих (например, клетки CHO)). Векторная ДНК может быть введена в прокариотические или эукариотические клетки с помощью традиционных методик трансформации или трансфекции. Известно, что для осуществления стабильной трансфекции клеток млекопитающих, в зависимости от применяемых экспрессионного вектора и методики трансфекции, только небольшая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. Для идентификации и отбора этих интегрантов, ген, который кодирует селектируемый маркер (например, устойчивости к антибиотикам), как правило, вводят в клетки-хозяева вместе с представляющим интерес геном. Предпочтительные маркеры селекции включают в себя маркеры, придающие устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин и метотрексат. Клетки, стабильно трансфицированные введенной нуклеиновой кислотой, наряду с другими способами могут быть идентифицированы посредством отбора по чувствительности к лекарственному препарату (например, клетки, в которые введен селектируемый маркерный ген, выживут, в то время как другие клетки погибнут).

[231] Также в данном документе предлагаются экспрессионные системы и конструкции в форме плазмид, экспрессионных векторов, кассет транскрипции или экспрессии, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, описанный выше, а также клетки-хозяева, содержащие такие экспрессионные системы или конструкции.

[232] Антиген-связывающие белки, предусмотренные в данном документе, могут быть получены посредством любой из множества традиционных методик. Например, белки, связывающие антиген Jagged1, могут быть получены с помощью рекомбинантных экспрессионных систем, с применением любой методики, известной из уровня 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 и Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

[233] Антиген-связывающие белки могут экспрессироваться в гибридных

клеточных линиях (например, определенные антитела могут экспрессироваться в гибридомах) или в клеточных линиях, отличных от гибридом. Экспрессионные конструкции, кодирующие указанные антитела, могут быть использованы для трансформации клетки-хозяина млекопитающего, насекомого или микробов. Трансформация может быть выполнена с помощью любого известного способа введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, в том числе, например, упаковки полинуклеотида в вирус или бактериофаг, и трансдукции клетки-хозяина с помощью данной конструкции в соответствии с процедурами трансфекции, известными из уровня техники, примеры которых приведены в патенте США № 4399216; № 4912040; № 4740461; № 4959455. Оптимальная используемая методика трансформации будет зависеть от того, какой тип клетки-хозяина подлежит трансформации. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(-ов) в липосомы, смешивание нуклеиновой кислоты с позитивного заряженными липидами, а также непосредственное микроинъектирование ДНК в ядра.

[234] Рекомбинантные экспрессионные конструкции, как правило, содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий одно или несколько из следующего: одну или несколько CDR, предусмотренных в данном документе; константную область легкой цепи; вариабельную область легкой цепи; константную область тяжелой цепи (например, C_H1, C_H2 и/или C_H3) и/или другой каркасный участок белка, связывающего антиген Jagged1. Данные нуклеотидные последовательности встраивают в соответствующий экспрессионный вектор с помощью стандартных методик лигирования. В одном варианте осуществления константную область тяжелой или легкой цепи присоединяют к С-концу специфической вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела к Jagged1 и лигируют в экспрессионный вектор. Вектор, как правило, выбирают таким образом, чтобы он был функциональным в определенной применяемой клетке-хозяине (то есть вектор совместим с аппаратом клетки-хозяина, что дает возможность осуществления амплификации и/или экспрессии гена). В некоторых вариантах осуществления применяют векторы, которые задействованы в структурном анализе комплементации фрагментов белка с применением белковых репортеров, таких как дигидрофолатредуктаза (см., например, патент США № 6270964, который включен в данный документ посредством ссылки). Подходящие экспрессионные векторы могут быть приобретены, например, у Invitrogen Life Technologies или BD Biosciences (ранее "Clontech"). Другие подходящие векторы для клонирования и экспрессии антител и фрагментов включают векторы, которые описаны в Bianchi and McGrew, 2003, *Biotech. Biotechnol. Bioeng.* 84:439–44, которая включена в данный документ посредством ссылки. Дополнительные подходящие экспрессионные векторы рассмотрены, например, в *Methods Enzymol.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York:

Academic Press.

[235] Как правило, экспрессионные векторы, используемые в любой из клеток-хозяев, содержат последовательности для поддержания плазмид, а также для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности, обобщенно называемые "фланкирующими последовательностями", в некоторых вариантах осуществления, как правило, содержат одну или несколько из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или несколько энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный участки сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей предназначенный для экспрессии полипептид, и элемент селективного маркера. Каждая из этих последовательностей рассматривается ниже.

[236] Необязательно вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", т. е. молекулу олигонуклеотида, расположенную на 5' или 3'-конце кодирующей последовательности белка, связывающего антиген Jagged1; олигонуклеотидную последовательность, кодирующую polyHis (такую как hexaHis) или другую "метку" такую как FLAG[®], HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Данную метку как правило сливают с полипептидом при экспрессии полипептида, и она может служить в качестве средства для аффинной очистки или обнаружения белка, связывающего антиген Jagged1, из клетки-хозяина. Аффинная очистка может быть выполнена, например, посредством колоночной хроматографии с применением антител к данной метке в качестве аффинной матрицы. Необязательно впоследствии метка может быть удалена из очищенного белка, связывающего антиген Jagged1, различными способами, такими как применение определенных пептидаз для расщепления.

[237] Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (то есть из того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (то есть из вида, отличного от вида и/или штамма клетки-хозяина), гибридными (то есть комбинация фланкирующих последовательностей больше чем из одного источника), синтетическими или нативными. Следовательно, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение, при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована аппаратом клетки-хозяина.

[238] Фланкирующие последовательности, пригодные для векторов, могут быть получены любым из нескольких способов, хорошо известных из уровня техники. Как правило, фланкирующие последовательности, применяемые в данном изобретении, будут

предварительно идентифицированы посредством картирования и/или посредством расщепления рестрикционной эндонуклеазой, и таким образом могут быть выделены из соответствующего тканевого источника с применением подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В данном случае фланкирующая последовательность может быть синтезирована с помощью описанных в данном документе способов для синтеза и клонирования нуклеиновых кислот.

[239] Если известна вся или только часть фланкирующей последовательности, то ее можно получить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или посредством скрининга геномной библиотеки с помощью подходящего зонда, такого как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности из того же или другого вида. Если фланкирующая последовательность не известна, фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, может быть выделен из более длинной части ДНК, которая может содержать, например, кодирующую последовательность, или даже другой ген или гены. Выделение может быть выполнено посредством расщепления рестрикционной эндонуклеазой с получением надлежащего фрагмента ДНК с последующим выделением с применением очистки на агарозном геле, хроматографии на колонке Qiagen[®] (Чатсворт, Калифорния) или других способов, известных специалисту в данной области техники. Выбор подходящих ферментов для выполнения данной задачи будет совершенно очевидным специалистам в данной области техники.

[240] Как правило, точка начала репликации представляет собой часть данных прокариотических экспрессионных векторов, приобретенных на коммерческой основе, и такая точка начала способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит точку начала репликации, его можно синтезировать химически на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а для клонирующих векторов в клетках млекопитающих используют различные вирусные точки начала репликации (например, SV40, полиома, аденовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусы, такие как HPV или BPV). В целом, компонент точки начала репликации необязателен в экспрессионных векторах млекопитающих (например, точку SV40 часто используют только потому, что она также содержит ранний вирусный промотор).

[241] Как правило, последовательность терминации транскрипции расположена в 3'-положении по отношению к концу кодирующей полипептид области и служит для терминации транскрипции. Обычно, последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой богатый G-C фрагмент, за которым следует поли-T-последовательность. Хотя данную последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести в коммерческих источниках в качестве части вектора, ее также можно легко синтезировать применяя способы синтеза нуклеиновых кислот,

приведенные в данном документе.

[242] Ген маркера селекции кодирует белок, необходимый для выживаемости и роста клетки-хозяина, растущей в селективной среде для культивирования. Типичные гены селективных маркеров кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, тетрациклину или канамицину для прокариотических клеток-хозяев; (b) дополняют ауксотрофные недостатки клетки; или (с) снабжают необходимыми питательными веществами, недоступными в сложных средах или средах определенного состава. Конкретными селектируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Преимущественно можно также использовать ген устойчивости к неомизину для селекции как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах.

[243] Для амплификации гена, который будет экспрессирован, могут быть использованы другие селектируемые гены. Амплификация представляет собой процесс, в котором гены, необходимые для продуцирования белка, крайне важного для роста или выживаемости клеток, повторяются последовательно в хромосомах последующих поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазу (DHFR) и беспромоторные гены тимидинкиназы. Трансформанты клеток млекопитающих выращивают при селекционном давлении, при этом только трансформанты адаптированы к тому, чтобы выжить благодаря наличию селектируемого гена в векторе. Селекционное давление устанавливают посредством культивирования трансформированных клеток в условиях, при которых концентрация средства селекции в среде последовательно увеличивается, тем самым обеспечивая амплификацию как гена селекции, так и ДНК, которая кодирует другой ген, такой как антиген-связывающий белок, который связывается с полипептидом Jagged1. В результате, из амплифицированной ДНК синтезируется повышенное количество полипептида, такого как антиген-связывающий белок.

[244] Как правило, сайт связывания рибосомы необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательностью Козак (эукариоты). Как правило, данный элемент расположен в 3'-положении по отношению к промотору и 5'-положении по отношению к кодирующей последовательности полипептида, подлежащего экспрессии.

[245] В некоторых случаях, таких, в которых гликозилирование является желательным в системе экспрессии эукариотической клетки-хозяина, для улучшения гликозилирования или выхода могут быть использованы различные предпоследовательности или пропоследовательности. Например, может быть изменен сайт расщепления пептидазы определенного сигнального пептида или добавлены пропоследовательности, которые также могут оказывать воздействие на гликозилирование. Конечный белковый продукт может иметь, в положении -1 (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка), одну или несколько дополнительных

аминокислот, характерных для экспрессии, которые могли быть не полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может иметь в сайте расщепления пептидазы один или два аминокислотных остатка, присоединенных к аминоконцу. В качестве альтернативы применение некоторых сайтов ферментативного расщепления может привести к получению слегка укороченной формы необходимого полипептида, если в данной области внутри зрелого полипептида происходит ферментативное расщепление.

[246] Экспрессия и клонирование, как правило, будут предусматривать промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей белок, связывающий антиген Jagged1. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше стартового кодона (т. е. 5') структурного гена (в общем, в пределах от приблизительно 100 до 1000 п. о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Условно промоторы группируют в один из двух классов: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы под своим контролем инициируют повышенные уровни транскрипции из ДНК в ответ на некоторое изменение в условиях культивирования, такое как наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы равномерно транскрибируют ген, с которым они функционально связаны, то есть происходит незначительный контроль экспрессии гена или его нет совсем. Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Подходящий промотор функционально связан с ДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепь, содержащую белок, связывающий антиген Jagged1, посредством удаления промотора из исходной ДНК с помощью расщепления ферментом рестрикции и вставки необходимой последовательности промотора в вектор.

[247] Подходящие промоторы для применения с дрожжевыми клетками-хозяевами также хорошо известны из уровня техники. Дрожжевые энхансеры предпочтительно применяют с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают без ограничения 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 В и вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы теплового шока и промотор актина.

[248] Энхансерная последовательность может быть вставлена в вектор для увеличения транскрипции ДНК, кодирующей легкую цепь или тяжелую цепь, содержащую белок, связывающий антиген Jagged1. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, длиной обычно приблизительно 10–300 п. о., которые воздействуют на промотор для повышения транскрипции. Энхансеры являются относительно независимыми от ориентации и положения, поскольку обнаруживаются в положениях в направлении как 5', так и 3' по отношению к транскрипционной единице.

Известно несколько энхансерных последовательностей, доступных из генов млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, альфа-фетопротеин и инсулин). Тем не менее, как правило, применяют энхансер из вируса. Известные в данной области техники энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансеры аденовирусов представляют собой типовые элементы, усиливающие активацию эукариотических промоторов. Хотя энхансер может быть расположен в векторе либо в 5'-позиции, либо в 3'-позиции по отношению к кодирующей последовательности, как правило, он расположен в сайте 5' от промотора. Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть встроена в экспрессионный вектор для способствования внеклеточной секреции антитела. Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности зависит от типа клеток-хозяев, в которых продуцируется антитело, а гетерологичная сигнальная последовательность может заменить нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, которые являются функциональными в клетках-хозяевах млекопитающих, включают следующее: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в Европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в Европейском патенте № 0460846.

[249] В одном варианте осуществления лидерная последовательность содержит SEQ ID NO: 355 (MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RC), которая кодируется SEQ ID NO: 356 (atggacatga gagtgctgc acagctgctg ggcctgctgc tgctgtggct gagaggcgcc agatgc). В другом варианте осуществления лидерная последовательность содержит SEQ ID NO: 357 (MAWALLLLTL LTQGTGSWA), которая кодируется SEQ ID NO: 358 (atggcctggg ctctgctgct cctcacctc ctactcagg gcacagggtc ctgggccc).

[250] Предлагаемые экспрессионные векторы могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать или могут не содержать все желаемые фланкирующие последовательности. Если вектор уже не содержит одну или несколько фланкирующих последовательностей, описанных в данном документе, их можно отдельно получить и лигировать в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области техники.

[251] После того, как вектор был сконструирован, а в подходящий сайт вектора была встроена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь, тяжелую цепь, или легкую цепь и тяжелую цепь, содержащую последовательность белка, связывающего антиген Jagged1, готовый вектор может быть встроен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформация экспрессионного вектора

для антиген–связывающего белка в выбранную клетку–хозяина может быть выполнена с помощью хорошо известных способов, в том числе трансфекции, инфекции, совместного осаждения фосфатом кальция, электропорации, микроинъектирования, липофекции, DEAE–декстран опосредованной трансфекции или других известных методик. Выбранный способ будет частично зависеть от типа используемой клетки–хозяина. Такие способы и другие подходящие способы широко известны специалистам в данной области техники и приведены, например, в Sambrook et al., 2001, выше.

[252] При культивировании в подходящих условиях клетка–хозяин синтезирует антиген–связывающий белок, который впоследствии может быть собран из культуральной среды (если клетка–хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки–хозяина, продуцирующей его (если оно не секретируется). Выбор подходящей клетки–хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как необходимые уровни экспрессии, полипептидные модификации, желательные или необходимые для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование) и легкость сворачивания в биологически активную молекулу.

[253] Клеточные линии млекопитающих, подходящие для экспрессии в качестве хозяев, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения immortalized клеточные линии из Американской коллекции типовых культур (ATCC), в том числе без ограничения овариальные клетки китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьян (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2) и ряд других линий клеток. В некоторых вариантах осуществления линии клеток могут быть выбраны посредством определения того, какие линии клеток обладают высокими уровнями экспрессии и конститутивно продуцируют антиген–связывающие белки, со свойствами, заключающимися в связывании Jagged1. В другом варианте осуществления может быть выбрана линия клеток из В–лимфоцитарной линии дифференцировки, которая не продуцирует свое собственное антитело, но обладает способностью продуцировать и секретировать гетерологичное антитело.

[254] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антиген–связывающему белку, продуцируемому клеткой, экспрессирующей один или несколько полинуклеотидов, указанных в таблицах 2, 3 и 4.

[255] В одном аспекте связывающий Jagged1 белок вводят для длительного лечения. В другом аспекте связывающие белки вводят для краткосрочного лечения.

[256] Также предусмотрены фармацевтические композиции, которые содержат белок, связывающий антиген Jagged1, и могут применяться в любом из профилактических и терапевтических способов, раскрытых в данном документе. В одном варианте осуществления также предусмотрено терапевтически эффективное количество одного или множества антиген–связывающих белков и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгирующее вещество, консервант и/или вспомогательное средство. Приемлемые материалы для составления являются нетоксичными для

реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях.

[257] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления для изменения, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидрогенсульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемообразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (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); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные средства или увлажняющие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, увеличивающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды-носителя для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические вспомогательные средства. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company предоставляет дополнительные подробности и варианты подходящих средств, которые могут быть включены в фармацевтические композиции.

[258] В некоторых вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая композиция будет определена специалистом в данной области техники в зависимости, например, от способа введения, формата доставки и желаемой дозы. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В некоторых вариантах осуществления такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса раскрытых антиген-связывающим белков *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления первичные среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть либо водными, либо неводными по

своей природе. Например, подходящие среда–носитель или носитель могут представлять собой воду для инъекций или физиологический солевой раствор. В некоторых вариантах осуществления композиции на основе белка, связывающего антиген Jagged1, могут быть получены для хранения посредством смешивания выбранной композиции, обладающей необходимой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в виде лиофилизированной таблетки или водного раствора. Дополнительно, в некоторых вариантах осуществления белок, связывающий антиген Jagged1, может быть составлен в виде лиофилизата с применением соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

[259] Фармацевтические композиции могут быть выбраны для парентеральной доставки. В качестве альтернативы композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Приготовление таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетентности в данной области техники.

[260] Компоненты состава присутствуют предпочтительно в концентрациях, которые приемлемы для места введения. В некоторых вариантах осуществления буферы применяют для поддержания композиции при физиологическом pH или при слегка более низком значении pH, как правило, pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8.

[261] Если предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции могут быть представлены в виде апиrogenного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего необходимый белок, связывающий антиген Jagged1 человека, в фармацевтически приемлемой среде–носителе. В частности, подходящей средой–носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой белок, связывающий антиген Jagged1, составлен в виде стерильного изотонического раствора, который хранится должным образом. В некоторых вариантах осуществления препарат может включать состав на основе желаемой молекулы со средством, таким как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством инъекции вещества замедленного всасывания. В некоторых вариантах осуществления также может быть использована гиалуроновая кислота, обладающая эффектом обеспечения пролонгированного пребывания в кровотоке. В некоторых вариантах осуществления для доставки необходимого антиген–связывающего белка могут применяться имплантируемые устройства доставки лекарственных средств.

[262] Некоторые фармацевтические композиции составляют для ингаляции. В некоторых вариантах осуществления белки, связывающие антиген Jagged1, составлены в виде сухого порошка, подходящего для ингаляции. В конкретных вариантах осуществления растворы белка, связывающего антиген Jagged1, для ингаляции также

могут быть составлены с пропеллентом для доставки в виде аэрозоля. В некоторых вариантах осуществления растворы могут быть распылены. Ингаляционное введение и способы составления дополнительно описаны в международной патентной заявке № PCT/US94/001875, которая включена посредством ссылки и описывает ингаляционную доставку химически модифицированных белков. Некоторые композиции могут быть введены перорально. Белки, связывающие антиген Jagged1, которые вводят таким образом, могут быть составлены с или без носителей, которые обычно применяются в составлении твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. В некоторых вариантах осуществления капсула может быть разработана для высвобождения активной части состава в точке желудочно-кишечного тракта, в которой биологическая доступность максимальна, а пресистемное разрушение минимально. Дополнительные средства могут быть включены для облегчения всасывания белка, связывающего антиген Jagged1. Также могут применяться разбавители, ароматизаторы, легкоплавкие воски, растительные масла, скользящие вещества, суспендирующие вещества, вещества для улучшения распадаемости таблеток и связывающие вещества.

[263] Некоторые фармацевтические композиции содержат эффективное количество одного или множества белков, связывающих антиген Jagged1, в смеси с нетоксичными вспомогательными веществами, которые являются подходящими для изготовления таблеток. Растворы могут быть получены в виде разовой дозы посредством растворения таблеток в стерильной воде или другой подходящей среде-носителе. Подходящие вспомогательные вещества включают без ограничения инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связывающие средства, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; или смазывающие средства, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

[264] Специалистам в данной области техники будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, в том числе составы, включающие белки, связывающие Jagged1, в виде составов, обеспечивающих замедленную или контролируемую доставку. Также специалистам в данной области техники известны методики составления ряда других составов с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и инъекции вещества замедленного всасывания. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, которая включена посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать в себя полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент EP № 058481, каждый из которых включен посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (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 (публикация заявки на европейский патент EP № 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены любым из нескольких способов, известных из уровня техники. См., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688–3692; публикации заявок на европейский патент №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки.

[265] Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предлагаются в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации с помощью стерильных фильтрационных мембран. Если композиция лиофилизирована, стерилизация с помощью данного способа может быть выполнена либо до лиофилизации и восстановления, либо после них. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в растворе. В целом, как правило, парентеральные композиции помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет для внутривенного раствора или флакон, с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

[266] В некоторых составах, антиген-связывающий белок имеет концентрацию, составляющую 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. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антиген-связывающий белок, буфер и полисорбат. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антиген-связывающий белок, буфер, сахарозу и полисорбат. Примером фармацевтической композиции является композиция, содержащая 50–100 мг/мл антиген-связывающего белка, 5–20 мМ ацетата натрия, 5–10% вес/об. сахарозы и 0,002–0,008% вес/об. полисорбата. Некоторые композиции, например, содержат 65–75 мг/мл антиген-связывающего белка в 9–11 мМ натрий-ацетатного буфера, 8–10% вес/об. сахарозы и 0,005–0,006% вес/об. полисорбата. В некоторых таких составах pH находится в диапазоне 4,5–6. Другие составы имеют pH, составляющий 5,0–5,5 (например, pH, составляющий 5,0, 5,2 или 5,4).

[267] После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла либо в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированные), которую восстанавливают перед введением. Также предлагаются наборы для производства формы для однократного введения дозы. Некоторые наборы содержат первый контейнер, содержащий сухой белок, и второй контейнер, содержащий водный состав. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким или лиофилизированным содержимым). Терапевтически эффективное

количество подлежащей применению фармацевтической композиции, содержащей белок, связывающий антиген Jagged1, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области техники поймет, что подходящие уровни дозирования для лечения будут варьироваться в зависимости, отчасти, от доставленной молекулы, показания, для которого применяют белок, связывающий антиген Jagged1, способа введения и размера (вес тела, поверхность тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. В некоторых вариантах осуществления клиницист может титровать дозу и изменять способ введения для получения оптимального терапевтического эффекта.

[268] Частота приема лекарственного средства будет зависеть от фармакокинетических параметров конкретного белка, связывающего антиген Jagged1, в применяемом составе. Как правило, клиницист вводит композицию до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая приводит к достижению желаемого эффекта. Поэтому композиция может быть введена в виде однократной дозы или в виде двух или более доз (которые могут содержать такое же количество желаемой молекулы или не содержать его) через какое-то время или в виде непрерывной инфузии посредством имплантации устройства или катетера. Соответствующие дозы могут быть определены посредством применения соответствующих данных о зависимости между дозой и эффектом лекарственного вещества. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающие белки могут вводиться пациентам в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах осуществления антиген–связывающий белок дозируют каждые две недели, каждый месяц, каждые два месяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые пять месяцев или каждые шесть месяцев.

[269] Способ введения фармацевтической композиции находится в соответствии с известными способами, например, пероральным, через инъекции внутривенным, внутрибрюшинным, внутрицеребральным (интрапаренхиматозным), интрацеребровентрикулярным, внутримышечным, внутриглазным, внутриартериальным, интрапортальным или внутриочаговым способом; с помощью систем с замедленным высвобождением или посредством имплантации устройств. В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть введены посредством болюсной инъекции или в течение длительного времени посредством инфузии, или посредством имплантации устройства.

[270] Композиция также может быть введена локально посредством имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, в который была впитана или инкапсулирована желаемая молекула. В некоторых вариантах осуществления, в которых применяют имплантацию устройства, устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, а доставка желаемой молекулы может быть выполнена посредством диффузии, болюса с контролируемым по времени высвобождением или непрерывного введения.

[271] Также может быть необходимо применение фармацевтических композиций

на основе белка, связывающего антиген Jagged1, в соответствии с раскрытым, *ex vivo*. В таких случаях клетки, ткани или органы, которые были удалены у пациента, подвергаются воздействию фармацевтических композиций на основе белка, связывающего антиген Jagged1, после чего клетки, ткани и/или органы впоследствии имплантируют обратно пациенту.

[272] Врач сможет выбрать подходящий показатель лечения и целевые уровни липидов в зависимости от индивидуального профиля конкретного пациента. Одним из общепринятых стандартов для лечения гиперлипидемии является Третий отчет Национальной экспертной группы по образованию в области холестерина (NCEP) по выявлению, оценке и лечению высокого уровня холестерина в крови у взрослых (группа III лечения взрослых) Заключительный отчет, Национальные институты здоровья, публикация NIH № 02–5215 (2002), печатная публикация которой полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[273] Эффективность конкретной дозы может быть оценена наблюдением биомаркеров или улучшения некоторых физиологических параметров. Примеры подходящих биомаркеров включают в себя соотношение свободного холестерина к липиду плазмы, свободного холестерина к мембранному белку, фосфатидилхолина к сфингомиелину, или уровни HDL–C.

[274] Также в данном документе предусмотрены композиции, содержащие белок, связывающий антиген Jagged1, и одно или несколько дополнительных терапевтических средств, а также способы, в которых такие средства вводят одновременно или последовательно с белком, связывающим антиген Jagged1, для применения в профилактических и терапевтических способах, раскрытых в данном документе. Одно или несколько дополнительных средств могут быть совместно составлены с белком, связывающим антиген Jagged1, или могут вводиться совместно с белком, связывающим антиген Jagged1. В целом, терапевтические способы, композиции и соединения также могут быть применены в комбинации с другими терапевтическими средствами в лечении различных болезненных состояний, при этом дополнительные средства вводятся одновременно.

[275] Белки, связывающие антиген Jagged1, которые приведены в данном документе пригодны для обнаружения Jagged1 в биологических образцах. Например, белки, связывающие антиген Jagged1, могут использоваться в диагностических анализах, например, анализах связывания для обнаружения и/или количественного определения Jagged1, экспрессируемого в сыворотке крови.

[276] Описанные в данном документе антиген–связывающие белки могут использоваться для диагностических целей для обнаружения, диагностирования или контроля заболеваний и/или состояний, связанных с Jagged1. Раскрытые антиген–связывающие белки обеспечивают средства для обнаружения наличия Jagged1 в образце 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). Обнаружение Jagged1 может быть проведено *in vivo* или *in vitro*.

[277] Варианты диагностического применения, предусмотренные в данном документе, включают применение антиген–связывающих белков для обнаружения экспрессии Jagged1. Примеры способов, применяемых для обнаружения наличия Jagged1, включают иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (RIA).

[278] Для диагностических применений антиген–связывающий белок, как правило, будет помечено с помощью обнаруживаемой группы мечения. Подходящие группы мечения включают без ограничения радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{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 лантанидов), ферментные группы (например, пероксидазу хрена, β –галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застёжки, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления группу мечения присоединяют к антиген–связывающему белку с помощью спейсерных "ножек" различной длины для уменьшения возможного стерического несоответствия. Из уровня техники известны и могут применяться различные способы мечения белков.

[279] В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий антиген Jagged1, выделен и измерен с применением методик, известных из уровня техники. См., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 и периодические дополнения); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons.

[280] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено обнаружение присутствия тестируемой молекулы, которая конкурирует за связывание с Jagged1 с предусмотренными антиген–связывающими белками. Пример одного из таких анализов предполагает обнаружение количества свободного антиген–связывающего белка в растворе, содержащем некоторое количество Jagged1, в присутствии или в отсутствие тестируемой молекулы. Увеличение количества свободного антиген–связывающего белка (т. е. антиген–связывающего белка, который не связывается с Jagged1) будет означать, что тестируемая молекула способна к конкурированию за связывание с Jagged1 с антиген–связывающим белком. В одном варианте осуществления антиген–связывающий белок метят с помощью группы мечения. В качестве альтернативы исследуемую молекулу метят, а количество свободной исследуемой молекулы контролируют в присутствии и в отсутствие антиген–связывающего белка.

[281] Белки, связывающие Jagged1, могут использоваться для лечения, диагностики

или улучшения состояния, связанного с заболеванием легкого. В различных вариантах осуществления заболевание легкого может являться раком легкого, инфекцией дыхательных путей или легкого, интерстициальным заболеванием, нарушением газообмена или циркуляции крови, заболеванием дыхательных путей или заболеванием плевры. Применяемый в данном документе термин "рак легкого" относится либо к первичной опухоли легкого (например, бронхогенная карцинома или бронхиальный карциноид), либо к метастазированию из первичной опухоли другого органа или ткани (например, молочная железа, толстая кишка, предстательная железа, почка, щитовидная железа, желудок, шейка матки, прямая кишка, семенник, кость или меланома). Применяемый в данном документе термин "инфекция дыхательных путей или легкого" относится к любой бактериальной, вирусной, грибковой или паразитарной инфекции любой части дыхательной системы. Применяемый в данном документе термин "интерстициальное заболевание" включает любое нарушение интерстиция, включая фиброз (например, интерстициальный легочный фиброз, интерстициальную пневмонию, интерстициальную болезнь легкого, клеточный гранулематоз Лангерганса, саркоидоз или идиопатический легочный гемосидероз). Применяемый в данном документе термин "нарушение газообмена или циркуляции крови" относится к любой аномалии, влияющей на распределение и/или обмен газа в/из крови и легких (например, отек легких, эмболия легких, дыхательная недостаточность (например, из-за слабых мышц), синдром острой дыхательной недостаточности или легочная гипертензия). Применяемый в данном документе термин "заболевание дыхательных путей" включает любое нарушение надлежащего дыхательного паттерна, включая нарушения по генетическим причинам и причинам, связанным с окружающей средой (например, астма, хронический бронхит, бронхиолит, кистозный фиброз, бронхоэктаз, эмфизема, хроническая обструктивная болезнь легких, диффузный панбронхиолит или лимфангиомиоматоз). Применяемый в данном документе термин "заболевание плевры" включает, например, плевральный выпот (например, гемоторакс (кровь в плевральном пространстве) или эмфизему (гной в плевральном пространстве)), пневмоторакс (воздух, например, травматический, спонтанный или напряженный), плеврит или фиброз плевры, или кальцификацию.

[282] В случае применения, состояние, связанное с заболеванием легкого, можно лечить посредством введения терапевтически эффективной дозы белка, связывающего Jagged1, пациенту, нуждающемуся в этом. Введение может быть выполнено, как описано в данном документе, например, путем внутривенной инъекции, внутривенной (IV) инъекции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции или перорально, в форме таблетки или в жидкой форме. В некоторых ситуациях терапевтически эффективная или предпочтительная доза белка, связывающего Jagged1, может быть определена клиницистом. Терапевтически эффективная доза белка, связывающего Jagged1, будет зависеть, помимо прочего, от режима введения, однократной дозы вводимого средства, независимо от того, вводится ли белок, связывающий Jagged1, в комбинации с другими терапевтическими средствами, иммунного статуса и здоровья реципиента. Термин

"терапевтически эффективный доза", применяемый в данном документе, означает количество белка, связывающего Jagged1, которое вызывает биологический или лекарственный ответ в тканевой системе, животном или человеке, предусмотренный исследователем, врачом или другим клиницистом, который включает облегчение или улучшение в отношении симптомов заболевания или нарушения, лечение которых осуществляют.

[283] Следует отметить, что фармацевтическая композиция, содержащая белок, связывающий Jagged1, может быть введена совместно с другим соединением. Идентичность и свойства соединения, вводимого совместно с белком, связывающим Jagged1, будут зависеть от характера состояния, подлежащего лечению или улучшению.

[284] Также предлагаются наборы для осуществления раскрытых способов. Такие наборы могут содержать фармацевтическую композицию, такую как те, что описаны в данном документе, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие предложенные в данном документе пептиды или белки, векторы и клетки, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, содержащие нуклеиновую кислоту, которые могут быть предоставлены в стерильном контейнере. Необязательно, инструкции о том, как применять предоставленную фармацевтическую композицию для лечения метаболического нарушения, также могут быть включены или предоставлены пациенту или поставщику медицинских услуг.

[285] В одном аспекте набор содержит (a) фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество белка, связывающего Jagged1, и (b) один или несколько контейнеров для фармацевтической композиции. Такой набор может также содержать инструкции по его применению; инструкции могут быть адаптированы к конкретному метаболическому нарушению, которое лечат. В инструкциях могут быть описаны применение и характер материалов, представленных в наборах.

[286] Инструкции могут быть напечатаны на подложке, такой как бумага или пластик и т. д., и могут присутствовать в наборах в виде листка-вкладыша, в виде этикетки на контейнере из набора или его компонентах (например, связанных с упаковкой), и т. д. В других вариантах осуществления инструкции представлены в виде файла данных для электронного хранения, предоставленного на подходящем считываемом компьютером носителе данных, например CD-ROM, дискете и т. д. В других вариантах осуществления фактические инструкции отсутствуют в наборе, но предоставляются средства для получения инструкций из удаленного источника, например, через Интернет. Примером данного варианта осуществления является набор, который содержит веб-адрес, по которому инструкции могут быть просмотрены и/или по которому инструкции могут быть загружены.

[287] Часто желательно, чтобы некоторые или все компоненты набора были упакованы в подходящую упаковку для поддержания стерильности. Компоненты набора могут быть упакованы в изолирующий элемент набора, чтобы получить единый, легко используемый блок, где изолирующий элемент набора, например, коробка или

аналогичная структура, может быть или не быть герметичным контейнером, например, для дальнейшего сохранения стерильность некоторых или всех компонентов набора.

[288] Примеры

[289] **Пример 1. Иммунизация**

[290] Полностью человеческие антитела к Jagged-1 получали с применением технологии XenoMouse, трансгенные мыши сконструированы для экспрессии различных репертуаров полностью человеческих антител IgGκ и IgGλ соответствующего изотипа (Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Jia, X. C., Maynard-Currie, C. E., Yang, X. D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C. M., Abderrahim, H., Kirschenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. H., Fukushima, A., Hales, J. F., Klapholz, S., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M., and Jakobovits, A. (1997) *Nature genetics* **15**, 146–156; Kellermann, S. A., and Green, L. L. (2002) *Current opinion in biotechnology* **13**, 593–597). Линии мышей XMG2-KL и XMG4-KL иммунизировали двумя формами иммуногена Jagged-1; трансфектанты 293Т, экспрессирующие полноразмерный Jagged-1 человека, и трансфектанты СНО, экспрессирующие полноразмерный Jagged-1 человека. Клеточные иммуногены вводили в дозе $4,0 \times 10^6$ трансфицированных Jagged-1 клеток/мышь и с последующими бустерными дозами, представляющими собой $2,0 \times 10^6$ трансфицированных Jagged-1 клеток/мышь. Используемые места инъекции представляли собой комбинацию подкожной инъекции у основания хвоста и внутрибрюшинной инъекции. В качестве вспомогательного средства использовали Alum (E.M. Sargent Pulp and Chemical Co., Клифтон, Нью-Джерси, № по кат. 1452–250) который получали в соответствии с инструкциями производителя и смешивали с раствором антигена. Мышей иммунизировали в течение периода от 8 недель до 12 недель.

[291] Образцы сыворотки крови собирали примерно на 5 неделе после первой инъекции и определяли специфические титры посредством FACS-окрашивания рекомбинантных рецепторов ВСМА, временно экспрессируемых на клетках СНО-S. Специфические иммунные ответы получали с применением групп иммуногена клеток СНО, которые определяли как превосходящие. Две группы иммунных животных идентифицировали и применяли для двух групп скрининга; первая группа животных включает 5 XMG2-KL и 3 XMG4-KL, иммунизированные клетками СНО, временно экспрессирующими Jagged-1, которые объединяли и доводили до образования антитела. Вторую группу составляли 7 XMG4-KL животных, иммунизированных клетками СНО, временно экспрессирующими Jagged-1, которую объединяли и доводили до образования антитела.

[292] **Пример 2. Получение моноклональных антител**

[293] Дренирующие лимфатические узлы и селезенки получали из иммунных животных и объединяли для каждой когорты. Лимфоциты и спленоциты отделяли от ткани в подходящей среде RPMI (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) для высвобождения клеток из ткани и суспендировали в RPMI. В-клетки отбирали и/или размножали с применением подходящего способа и сливали с подходящим партнером по слиянию,

например, несекреторными клетками миеломы P3X63Ag8.653 (Американская коллекция типовых культур CRL 1580; Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548–1550).

[294] В-клетки смешивали с клетками партнера по слиянию в соотношении 1:4. Смесь клеток осторожно осаждали посредством центрифугирования при 400 x g в течение 4 минут, супернатант подвергали декантации и смесь клеток осторожно перемешивали с применением пипетки объемом 1 мл. Слияние индуцировали с помощью PEG/DMSO (полиэтиленгликоль/диметилсульфоксид; получено от Sigma–Aldrich, Сент–Луис, Миссури; 1 мл на 10 миллионов лимфоцитов). PEG/DMSO медленно добавляли с осторожным помешиванием в течение одной минуты, затем смешивали в течение одной минуты. Затем добавляли IDMEM (DMEM без глутамина; 2 мл на 10 миллионов В-клеток) в течение 2 минут с осторожным помешиванием с последующим добавлением IDMEM (8 мл на 10 миллионов В-клеток), которую добавляли в течение 3 минут.

[295] Слитые клетки осторожно осаждали (400 x g 5–6 минут) и ресуспендировали в 20 мл селекционной среды (например, DMEM, содержащей азасерин и гипоксантин [HA] и другие дополнительные материалы при необходимости) на 20 миллионов В-клеток. Клетки инкубировали в течение 20–30 минут при 37°C, а затем ресуспендировали в 200 мл селекционной среды на 20 миллионов В-клеток и культивировали в течение трех – четырех дней в колбах T175 до высевания в 96–луночные планшеты.

[296] Клетки распределяли в 96–луночные планшеты с применением стандартных методик для максимального увеличения клональности полученных колоний. Через несколько дней культивирования супернатанты гибридомы собирали и подвергали скрининговым анализам, как подробно описано в примерах ниже, включая подтверждение связывания с рецептором Jagged–1 человека, идентификацию антител, блокирующих лиганд Notch, посредством анализа конкуренции за связывание лиганда и оценки перекрестной реактивности с другими рецепторами, которые связаны с рецептором Jagged–1 (например, рецепторами Jagged–2 человека и DLL–4 человека). Линии гибридомы, которые идентифицировали как обладающие интересующими свойствами связывания, затем дополнительно отбирали посредством функциональных скринингов и подвергали стандартным методикам клонирования и субклонирования. Клональные линии размножали *in vitro* и осуществляли секвенирование секретируемых антител человека, полученных для анализа, и V–гена.

[297] Пример 3. Отбор антител, специфически связывающих рецептор Jagged–1, с помощью FMAT

[298] После 14 дней культивирования супернатанты гибридомы подвергали скринингу на предмет специфических моноклональных антител к Jagged–1 человека с помощью технологии флуорометрического анализа в микрообъеме (FMAT) (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорния). Супернатанты подвергали скринингу в отношении клеток 293Т, временно трансфицированных посредством Jagged–1 человека, и обратному скринингу в отношении клеток 293Т, временно трансфицированных посредством той же плазмиды экспрессии, которая не содержит ген Jagged–1.

[299] Вкратце, клетки в среде Freestyle (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) высевали в 384-луночные планшеты для FМAT в объеме 50 мкл/лунка при плотности примерно 4000 клеток/лунка для устойчивых трансфектантов и при плотности примерно 16000 клеток/лунка для исходных клеток, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем добавляли 10 мкл/лунка супернатанта и планшеты инкубировали в течение примерно одного часа при 4°C, после чего добавляли 10 мкл/лунка вторичного антитела к IgG–Cy5 человека (Jackson Immunoresearch, Запад Гров, Пенсильвания) при концентрации 2,8 мкг/мл (конечная концентрация 400 нг/мл). Затем планшеты инкубировали в течение одного часа при 4°C и флуоресценцию считывали с применением планшет-ридера FМAT (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорния).

[300] После двух циклов скрининга идентифицировали выборку из 495 (335 в группе №1, 160 в группе №2) линий гибридом, продуцирующих антитела, связывающие Jagged–1, и подвергали дополнительным анализам для получения характеристик.

[301] Пример 4. Идентификация блокирующих антител посредством анализа конкуренции за связывание лиганда с помощью FМAT

[302] Разрабатывали способ конкурентного связывания лиганда для определения антител (в супернатантах гибридомы), которые связывают рецептор Jagged–1 и блокируют связывание лиганда Notch–3. Вкратце, клетки в среде Freestyle (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) высевали в 384-луночные планшеты для FМAT в объеме 50 мкл/лунка при плотности примерно 3000 клеток/лунка для устойчивых трансфектантов и при плотности примерно 15000 клеток/лунка для исходных клеток, и импульсно центрифугировали. Затем добавляли 20 мкл/лунка супернатанта и планшеты инкубировали в течение примерно одного часа при 4°C, после чего добавляли 10 мкл/лунка Notch–3 человека/ALEXA647 (конечная концентрация 600 нг/мл). Затем планшеты инкубировали в течение трех часов при 4°C и флуоресценцию считывали с применением планшет-ридера FМAT (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорния).

[303] Эксперименты включали супернатанты отрицательного контроля гибридомы. Средний сигнал, наблюдаемый в таких экспериментах с отрицательным контролем, принимали за максимально возможный сигнал для анализа. Экспериментальные супернатанты сравнивали с данными максимальными сигналами и рассчитывали процент ингибирования для каждой лунки ($\% \text{ ингибирования} = (1 - (\text{FL1 супернатанта гибридомы с антителами к ВСМА} / \text{максимальный сигнал FL1}))$).

[304] Для скрининговой группы №1 проводили два повтора анализа и получали 49 антител, представляющих интерес, на основе активности ингибирования более 60% в по меньшей мере одном из двух повторов. Эти 49 супернатантов гибридомы плюс 10 неблокирующих супернатантов переносили далее на дополнительное тестирование. Для скрининговой группы №2 с помощью двух повторов анализа получали 4 супернатанта гибридомы, идентифицированных с более 60% ингибирования, которые переносили далее на дополнительное определение характеристик.

[305] Пример 5. Идентификация блокирующих антител посредством анализа

конкуренции за связывание лиганда с помощью FACS

[306] Разрабатывали способ конкурентного связывания лиганда для определения антител (в супернатантах гибридомы), которые связывают рецептор Jagged-1 и блокируют связывание трех лигандов: Notch-3, Notch 2 и Notch-1. FACS-анализы проводили посредством инкубирования 20 мкл супернатантов гибридомы с 50000 клеток, временно экспрессируемых при 4°C в течение одного часа с последующими двумя промывками посредством PBS/BSA. Затем клетки обрабатывали с помощью 5 мкг/мл лиганда Notch-3, меченного флуорохромом (№1559-NT, RnD Systems), при 4°C с последующими двумя промывками. Клетки ресуспендировали в 1 мл PBS/BSA и связывание антител анализировали с применением прибора FACSCalibur™. Подобные анализы проводили с применением Notch-2 (№3735-NT, RnD Systems) и Notch-1 (№3647-TK, RnD Systems).

[307] Эксперименты включали отрицательный контроль гибридомы супернатантов. Средний сигнал, наблюдаемый в таких экспериментах с отрицательным контролем, принимали за максимально возможный сигнал для анализа. Экспериментальные супернатанты сравнивали с данными максимальными сигналами и рассчитывали процент ингибирования для каждой лунки ($\% \text{ ингибирования} = (1 - (\text{FL1 супернатанта гибридомы с антителами к ВСМА/максимальный сигнал FL1}))$).

[308] Пример 6. Дополнительное определение характеристик связывания посредством проточной цитометрии (FACS)

[309] FACS-анализы связывания проводили для оценки связывания специфического антитела к рецептору Jagged-1 с мышинным ортологом Jagged-1, а также с родственными рецепторами Jagged-2 человека и DLL-4 человека. FACS-анализы проводили путем инкубирования супернатантов гибридомы с 50000 клеток при 4°C в течение одного часа с последующими двумя промывками посредством PBS/BSA. Затем клетки обрабатывали с помощью меченного флуорохромом вторичного антитела при 4°C с последующими двумя промывками. Клетки ресуспендировали в 1 мл PBS/BSA и связывание антител анализировали с применением прибора FACSCalibur™.

[310] Пример 7. Идентификация антагонистов функции с помощью клеточного биологического анализа.

[311] Нормальные клетки бронхиального эпителия человека и питательную среду приобретали у Lonza. Культивирование на границе раздела водной и воздушной сред с применением клеток 2 пассажа, проводили в соответствии с инструкциями производителя с использованием протокола Lonza B-ALI. Через три недели после переноса по воздуху культуры обрабатывали с применением или без применения IL-13 (20 нг/мл) в комбинации с IgG1 (10 мкг/мл); антителом к Jag-1 (15D11.1) (10 мкг/мл или 1 мкг/мл) в течение 7 дней (добавляли базолатерально к среде). Свежие среды (с или без обработки) меняли через день. Через 7 дней культуры фиксировали в 4% PFA в течение 48 ч. при к. т., а затем переносили в 70% EtOH и хранили при 4°C до обработки для окрашивания PAS/AB. См. фиг. 1 и фиг. 2.

[312] Пример 8. Способы окрашивания PAS/AB и способ количественного

определения.

[313] *Окрашивание Шифф–йодной кислотой/альциановым синим при культивировании на границе раздела водной и воздушной сред.*

[314] Бронхиальные эпителиальные клетки, полученные от доноров NHBE, культивировали на границе раздела водной и воздушной сред (ALI), фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 48 часов при комнатной температуре (к. т.) и заключали в парафин. Срезы толщиной четыре микрона окрашивали на предмет муцина/бокаловидных клеток посредством специального красителя альцианового синего/Шифф–йодной кислоты (AB/PAS).

[315] Вкратце, после депарафинизации срезы обрабатывали раствором уксусной кислоты в течение 3 минут при к. т. с последующим окрашиванием альциановым синим (pH 2,5, Abscam, Кембридж, Массачусетс; № по кат. ab150662) в течение 30 минут при к. т. После промывания в водопроводной воде в течение 2 минут с последующим промыванием в 2 сменах дистиллированной воды срезы обрабатывали посредством 1% раствора йодной кислоты (Sigma, Сент–Луис, Миссури; № по кат. 3951) в течение 10 минут при к. т. Срезы промывали еще раз в 2 сменах дистиллированной воды и последовательно окрашивали посредством раствора Шиффа (American Master Tech, Лодай, Калифорния; № по кат. STSSCHLT) в течение 10 минут при к. т. Затем срезы промывали в горячей проточной водопроводной воде, затем в дистиллированной воде и затем докрашивали модифицированным гематоксилином Майера (American Master Tech, Лодай, Калифорния; № по кат. HSMMHLT) в течение 15 секунд. Срезы последовательно окрашивали в синий с использованием буфера TBS, промывали дистиллированной водой, обезвоживали в спиртах, очищали в ксилолах и затем накрывали покровным стеклом с применением среды для заливки Tissue–Tek ® GlasTM (Sakura, Торранс, Калифорния; № по кат. 6419).

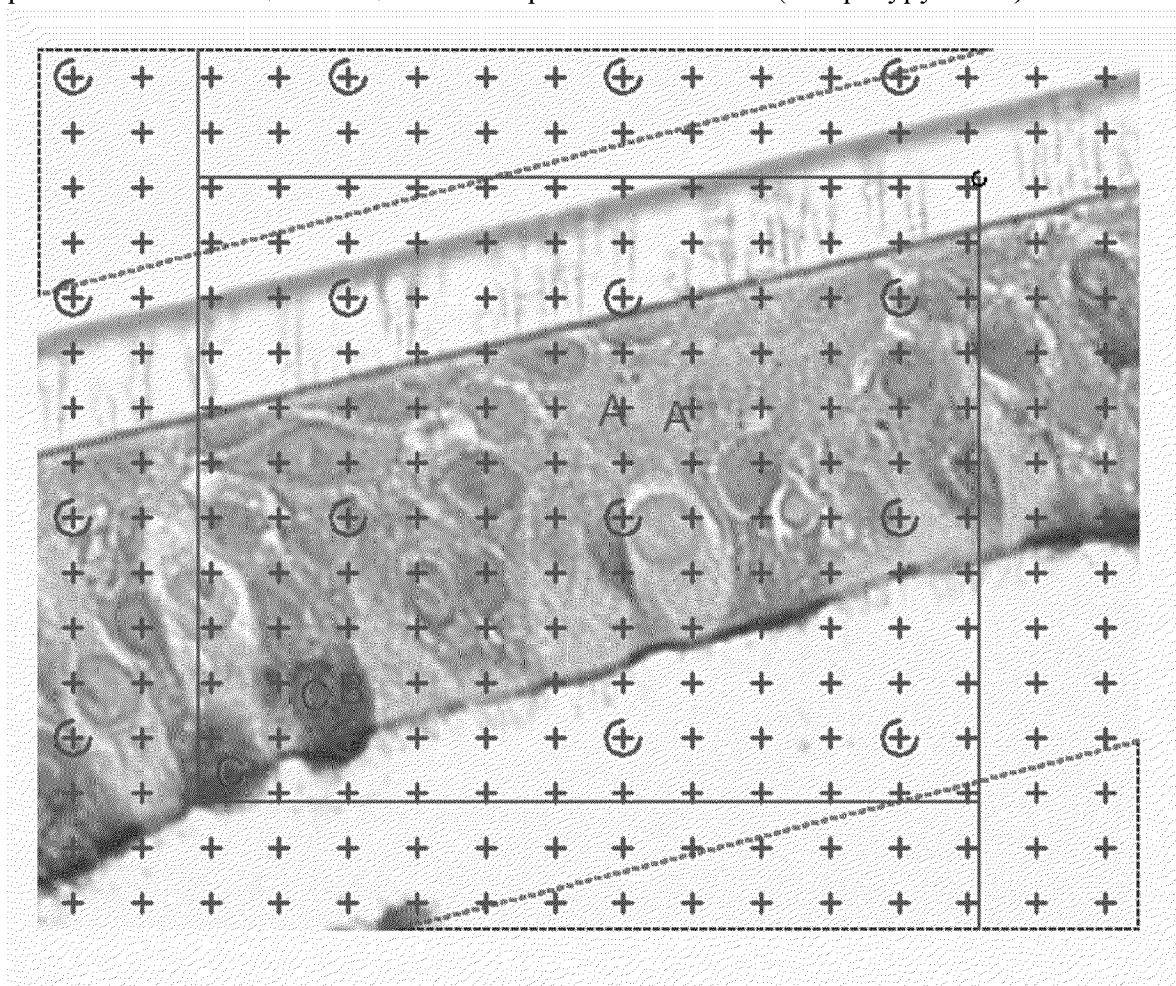
[316] *Окрашивание легких мыши Шифф–йодной кислотой.*

[317] Легкие мыши фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов при комнатной температуре (к. т.) и заключали в парафин. Срезы толщиной пять микрон окрашивали на предмет муцина/бокаловидных клеток посредством специального красителя Шифф–йодной кислоты (PAS) Вкратце, после депарафинизации срезы обрабатывали посредством свежеприготовленной 0,5% йодной кислоты в течение 7 минут при к. т. После промывания в дистиллированной воде срезы погружали в раствор Шиффа (American Master Tech, Лодай, Калифорния; № по кат. STSSCHLT) на 15 минут при к. т. Затем срезы промывали в теплой проточной водопроводной воде в течение 5 минут и последовательно докрашивали гематоксилином SelecTech 560 (Leica Biosystems; Буффало Гров, Иллинойс; № по кат. 3801575) в течение 3 минут при к. т. Затем срезы обрабатывали посредством SelecTech Define (Leica Biosystems, № по кат. 3803590) и окрашивали в синий посредством Blue Buffer (Leica Biosystems, № по кат. 3802915). Затем срезы промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах, очищали в ксилолах и затем накрывали покровным стеклом с применением среды для заливки Tissue–Tek ®

GlasTM (Sakura, Торранс, Калифорния; № по кат. 6419).

[318] *Количественное определение объема муцина и числа бокаловидных клеток в культурах ALI*

[319] В парафиновых срезах толщиной четыре микрона с эпителиальными клетками бронхов, которые культивировали на границе раздела водной и воздушной сред (ALI), окрашивали на предмет муцина/бокаловидных клеток с применением специального красителя альцианового синего/Шифф-йодной кислоты, было количественно определено процентное содержание муцина, а также число присутствующих бокаловидных клеток в эпителии. С использованием интеграционного пакета программного обеспечения Visiopharm (Херсхольм, Дания) весь участок культуры ALI очертили и выбрали произвольным образом часть среза для определения содержания муцина и числа бокаловидных клеток в эпителии посредством размещения сетки точек над каждым полем зрения с увеличением 100X, и подсчитывали число точек, которые располагаются на всей области эпителия по сравнению с числом точек, которые располагаются на муцине, окрашенном с помощью специального красителя АВ/PAS (см. фигуру ниже).



[320] Таким образом примерно 75% общей площади среза выбирали равномерно произвольным образом, при этом под меткой А указаны все точки, которые попадают на эпителий, под В указаны все точки, которые попадают на муцин/бокаловидные клетки, и под С указано количество точек для каждой бокаловидной клетки (показаны не все

возможные значения). После того, как все значения свели в таблицы и суммировали, следующие два расчета проводили с применением инструмента калькулятора в программном обеспечении.

[321] *Объем муцина/объем эпителия (доля в процентах запасенного муцина, присутствующего в эпителии):*

$$[322] V_v = P_{\text{sub}} / P_{\text{ref}},$$

[323] где

[324] P_{sub} = общее число подсчетов муцина

[325] P_{ref} = общее число подсчетов общего эпителия

[326] Объем общего муцина выражен в виде доли в процентах муцина, присутствующего в общем эпителии.

[327] *Число бокаловидных клеток/объем эпителия:*

$$[328] N_{\text{бокаловидные клетки}} / V_{\text{эпителий}} = \sum Q^- / BA \times (a/p) \times \sum P,$$

[329] где

[330] $\sum Q^-$ = число подсчитанных бокаловидных клеток

[331] BA = толщина среза

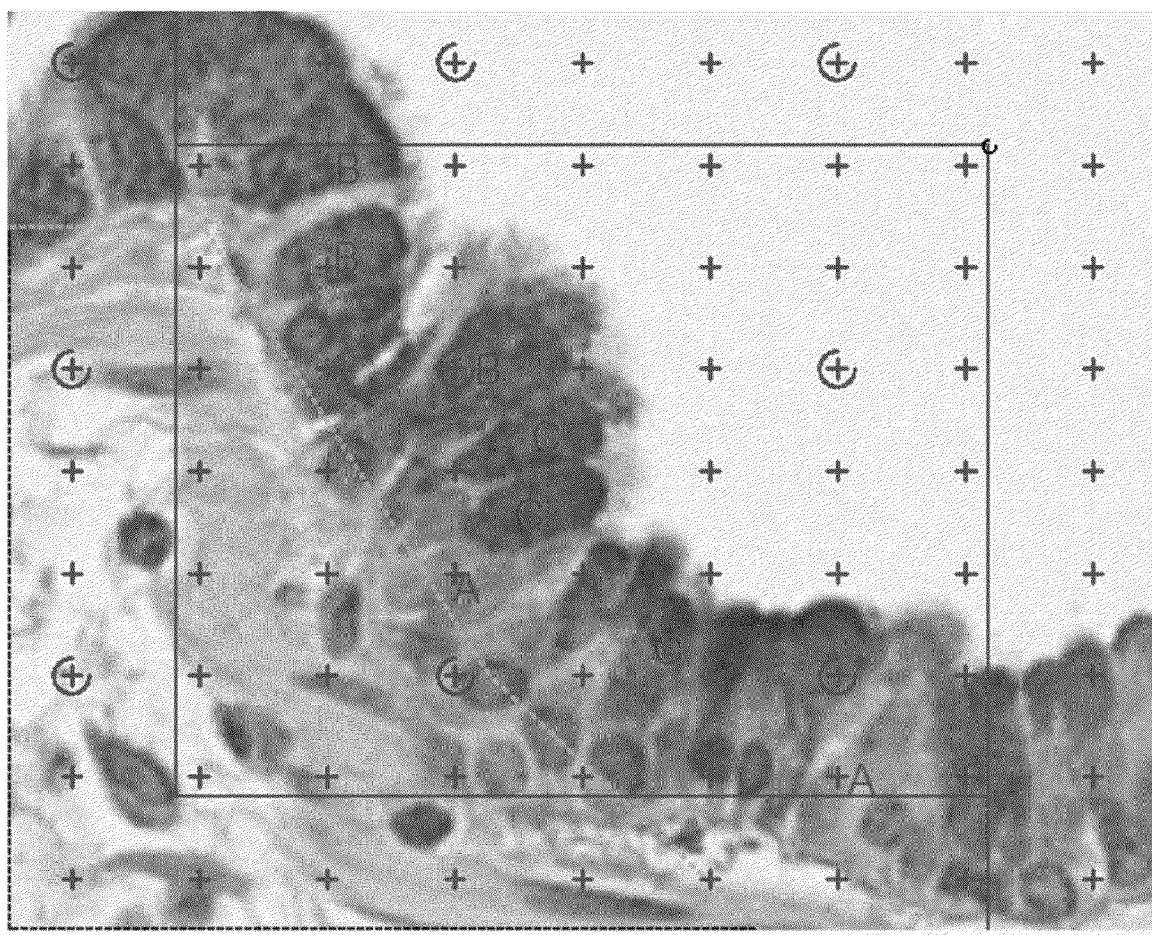
[332] a/p = площадь на точку

[333] $\sum P$ = число подсчитанных точек площади

[334] Число бокаловидных клеток в эпителии выражено как число бокаловидных клеток на объем эпителия в мм^3 или $N_{\text{бокаловидные клетки}} / \text{мм}^3$ эпителия

[335] *Количественное определение объемов муцина и бокаловидных клеток в дыхательных путях мыши*

[336] В парафиновых срезах легких мыши, которые окрашивали на предмет муцина/бокаловидных клеток с применением специального красителя альцианового синего/Шифф-йодной кислоты, толщиной пять микрон, было количественно определено процентное содержание муцина, а также число присутствующих бокаловидных клеток в эпителии. С использованием интеграционного пакета программного обеспечения Visiopharm (Херсхольм, Дания), дыхательные пути мыши, представляющие интерес, очертили и выбрали произвольным образом часть среза для определения содержания муцина и числа бокаловидных клеток в эпителии посредством размещения сетки точек над каждым полем зрения с увеличением 100X, и подсчитывали число точек, которые располагаются на всей области эпителия по сравнению с числом точек, которые располагаются на муцине, окрашенном с помощью специальных красителей AB/PAS (см. фигуру ниже).



[337] Таким образом примерно 75% общей площади области, представляющей интерес, т. е. мышинового эпителия, выбирали равномерно произвольным образом, при этом под меткой А указаны все точки, которые попадают на эпителий, под В указаны все точки, которые попадают на муцин/бокаловидные клетки, и под С указано количество точек для каждой бокаловидной клетки (показаны не все возможные значения). После того, как все значения свели в таблицы и суммировали, следующие два расчета проводили с применением инструмента калькулятора в программном обеспечении.

[338] *Доля в процентах муцина/площади эпителия (доля в процентах запасенного муцина, присутствующего в эпителии):*

$$[339] V_v = P_{\text{sub}} / P_{\text{ref}},$$

[340] где

[341] P_{sub} = общее число подсчетов муцина

[342] P_{ref} = общее число подсчетов общего эпителия

[343] Объем общего муцина выражен в виде доли в процентах муцина, присутствующего в общем эпителии дыхательных путей мыши.

[344] *Число бокаловидных клеток/площади эпителия:*

$$[345] N_{\text{бокаловидные клетки/площадь эпителий}} = \sum Q^- / (a/p) \times \sum P,$$

[346] где

[347] $\sum Q^-$ = число подсчитанных бокаловидных клеток

[348] a/p = площадь на точку

[349] $\sum P$ = число подсчитанных точек площади

[350] Число бокаловидных клеток в эпителии выражено как число бокаловидных клеток на площадь эпителия в мм^2 или $N_{\text{бокаловидные клетки}}/\text{мм}^2$ эпителия

[351] Нормальные клетки бронхиального эпителия человека и питательную среду приобретали у Lonza. 3D–культивирование бронхосфер с применением клеток 2 пассажа проводили как описано ранее (см. Danahay et al). Через одну неделю после высевания культуры обрабатывали с использованием или без использования IL–13 (1 нг/мл или 3,3 нг/мл) в комбинации с IgG1 (10 мкг/мл); антителом к Jag–1 (15D11.1) (10 мкг/мл или 1 мкг/мл) в течение дополнительных 7 дней. Свежие среды (с или без обработки) меняли через день и дополняли свежим цитокином и обработкой. Через 7 дней бронхосферы собирали из матригеля с применением набора для сбора клеток из 3D–культур Cultrex от Trevigen (№ по кат. 3448–020–K) со слегка измененным протоколом производителей. РНК выделяли с применением набора RNeasy от Qiagen (№ по кат. 74181) в соответствии с протоколом производителя и проводили qPCR в отношении MUC5AC (*см. ниже); MUC5B (*см. ниже) и FOXA3 (Hs00270130–m1). См. фиг. 3. HPRT (*см. ниже) использовали в качестве гена домашнего хозяйства и экспрессию гена выражали относительно HPR.

[352] *Профилактическое ингибирование метаплазии бокаловидных клеток с помощью Ab, нейтрализующего Jag1, в модели астмы, индуцированной овальбумином, и оценка токсикологии ткани.*

[353] Воспаление легких мыши, индуцированное аллергеном, и ремоделирование дыхательных путей (метаплазия бокаловидных клеток) измеряли в модели астмы у мыши, индуцированной овальбумином. В данном исследовании использовали семь групп по восемь мышей (56 мышей всего). Взрослых самок мышей Balb/c (старше 8 недель) сенсibilizировали и стимулировали посредством внутрибрюшинной (i.p.) инъекции 0,2 мл 2% геля гидроксида алюминия (ALUM) (Serva Electrophoretics, 12261, Гейдельберг, Германия) с использованием или без использования 10 мкг антигена овальбумина (OVA) (Worthington Biochemical Corporation, LS003054, Лейквуд, Нью–Джерси) в дни 0 и 14. Группы А, В и С сенсibilizировали и стимулировали с помощью i.p. инъекций 0,2 мл раствора одного мл 0,9% солевого раствора в 50 мл геля ALUM. Группы D, E, F и G сенсibilizировали и стимулировали с помощью i.p. инъекций 0,2 мл раствора 2,55 мг OVA, растворенного в одном мл 0,9% солевого раствора в 50 мл геля ALUM. Группы D, E, F и G подвергали ингаляциям распыленного OVA, чтобы вызвать антиген–индуцированное воспаление легкого и метаплазию бокаловидных клеток в легких. Для стимуляции распыленным OVA мышей помещали в коробку из плексигласа и аэрозольный OVA распыляли внутрь коробки посредством распылителя (PARI Respiratory Equipment, распылитель LC STAR и компрессор Proneb Ultra II, Мидлоттиан, Вирджиния), заполненного 1% овальбумином в солевом растворе (0,01 г/мл), в течение 20 минут в дни 21, 22 и 23. В день 26 проводили 20–минутную стимуляцию распыленным OVA с

использованием 5% овальбумина в солевом растворе. Группы А, В и С подвергали ингаляции распыленным солевым раствором без ОВА. Группам А и D дозировали среду-носитель (A52SuT: 20 мМ ацетата натрия, 5% сахарозы, 0,04% Tween 20, регулировали до pH 5,2 с помощью уксусной кислоты), группам В и Е дозировали mAb 15D11.1 человека к <Jag-1 человека> (80 мг/кг), группе G дозировали IgG2a крысы к <muTSLP> (mTSLP-M702, 20 мг/кг) и группам С и F дозировали 655-341-G1 IgG1 контрольное антитело человека (80 мг/кг). Всем группам дозы вводили внутривенно в хвостовую вену в объеме 10 мл/кг в дни 0, 7, 14 и 20. См. фиг. 4. В день 27 мышей подвергали эвтаназии и легкие наполняли 10% нейтральным забуференным формалином через трахеальные канюли. Наполненные легкие погружали в формалин на по меньшей мере 24 ч. После помещения в парафиновые блоки легкие разрезали (5 мкм) и размещали на предметных стеклах. Срезы легких окрашивали с помощью гематоксилина и эозина (H&E) для оценки инфильтрации воспалительных клеток или с помощью Шифф-йодной кислоты (PAS) для оценки содержания муцина. Окрашенные с помощью H&E срезы почки, селезенки, тимуса, печени, сердца, яичника, поджелудочной железы, толстой кишки, двенадцатиперстной кишки, желудка, подвздошной кишки, тонкой кишки и бедренной кости из групп А, В и С также получали для оценки токсикологом.

[354] Четыре недели блокирования Jag1 посредством mAb 15D11.1 не вызывало потери веса тела. Мышей сенсibilizировали и стимулировали посредством внутрибрюшинной (i.p.) инъекции 0,2 мл 2% гидроксида алюминия без или с 10 мкг антигена овальбумина (OVA) в дни 0 и 14, а затем стимулировали ингаляционным (И) ОВА для индуцирования воспаления и метаплазии бокаловидных клеток. Среду-носитель, антитело mAb 15D11.1 к Jag1 (80 мг/кг), антитело изотипического контроля 655-341-G1 IgG1 человека (80 мг/кг) или IgG2a крысы к <muTSLP> (20 мг/кг) дозировали раз в неделю в дни 0, 7, 14 и 20. Отклонения усредненного веса тела (ось y) от исходного уровня показаны с течением времени (ось x). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (n=7-8). У мышей, обработанных антителом к Jag1, не наблюдали потери веса, в отличие от мышей, обработанных средой-носителем или антителом изотипического контроля. Однако i.p. сенсibilизация и И ОВА вызывали временную потерю веса во всех группах. Фиг. 5А. Изменения веса тела для всех групп. Группы мышей, сенсibilизированные без применения и с применением ОВА, показаны по отдельности на графике на фиг. 5В и на фиг. 5С.

[355] **Пример 9. Оценка аффинности связывания mAb 15D11.1 человека к hJagged1 с hJagged1**

[356] mAb 15D11.1 к hJagged1 (PL-50432) оценивали в отношении его аффинности к рекомбинантному внеклеточному домену Jagged1 человека (Met 1 – Ser 1046), слитому с полигистидиновой меткой на С-конце, и продуцируемому в клетке человека, и получали от Creative Biomart (№ по кат. JAG1-3226H). Кинетика связывания и аппроксимирующая кривая для концентраций антигена 50, 15,3, 5,1, 1,7 и 0,56 нМ показаны на фигуре 6.

[357] Аффинность растворимого рекомбинантного hJagged1 определяли на

платформе Octet (Octet Red96) в соответствии с рекомендуемыми производителем настройками кинетических измерений. Вкратце, hJagged1 разбавляли 1 к 3 150 нМ–0,5 нМ в буфере Octet (10 мМ основания Tris, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 0,1 мг/мл BSA, 0,1% Triton X100) и 60 мкл данных серийно разбавленных образцов отбирали в черный полипропиленовый 384–луночный микропланшет с наклонным дном (TW384) (Forte Bio, № по кат.18–0019) (планшет для образцов). 3 мкг/мл mAb 15D11.1 к hJagged1, присутствующего в 60 мкл в планшете для образцов, использовали и фиксировали на биосенсорах АНС – к HuFc (Kinetic) (№ по кат. 18–5060). Образец только с буфером использовали в качестве контроля.

[358] Антитело фиксировали в течение 300 сек., ассоциацию и диссоциацию измеряли в течение 300 и 1200 сек. соответственно. Программное обеспечение ForteBio для анализа данных версии 9.0.0.12 применяли для исследования ассоциации (300 сек.) и диссоциации (900 сек.) и для измерения кинетики.

[359]

[360] Пример 10. Аффинность в отношении клеточной поверхности, определенная с помощью измерения равновесного показателя с применением KinExA

[361] mAb 15D11.1 к hJagged1 (PL–50432) оценивали в отношении его аффинности к нативному Jagged1 человека, экспрессированному в стабильной линии клеток 293.

[362] Клетки в среде последовательно разбавляли и инкубировали с концентрацией активного сайта связывания антитела 30 пМ или 1 нМ в среде в присутствии 0,05% NaN₃ и обеспечивали уравнивание. Свободное mAb, оставшееся в супернатанте, измеряли как объясняется в тексте. (Фиг. 7А) % свободного mAb (красная кривая для 30 пМ и синяя кривая для 1 нМ) нанесен на график в зависимости от концентрации клеток. Проводили анализ N–кривой с помощью равновесного способа с использованием целых клеток для определения оптимальных значений K_d и уровня экспрессии антигена. (Фиг. 7В и 7С) 95% доверительные интервалы определяли путем многократного изменения оптимизированного значения для K_d или уровня экспрессии антигена при сохранении других параметров на их оптимальных значениях.

[363] Аффинность mAb 15D11.1 определяли путем измерения равновесной константы диссоциации (K_d). Применяли анализ кинетического исключения (KinExA), в котором K_d определяли из концентрации свободного антитела, которое остается в растворе после достижения равновесия между антителом и антигеном, экспрессируемым на клеточной поверхности. Более ресурсоемкий анализ KinExA обеспечивает более чувствительное определение аффинности связывания для нативных форм Jagged1, чем система анализа Octet на основе растворимого Jagged1. Затем применяли способ анализа кинетического исключения по Rathanaswami et al. (2008). (Rathanaswami et al., High affinity binding measurements of antibodies to cell–surface–expressed antigens, Analytical Biochemistry 373:52–60 (2008)). Вкратце, два различных варианта равновесных условий обеспечивали с применением индуцированных доксициклином клеток, экспрессирующих Jagged1. Клетки

подвергали диссоциации клеток в растворе для диссоциации клеток, промывали дважды ледяным 1X PBS и подсчитывали с применением гемоцитометра. Клетки титровали и инкубировали с двумя различными постоянными концентрациями антитела, одна из которых составляла 30 пМ и другая 1 нМ. Клеточные титры и растворы антитела помещали в среды с 0,05% азида натрия. Клетки титровали из концентрации 8,33 миллиона на миллилитр, 1 к 3, на 10 делениях в пробирках Falcon объемом 50 мл. Для условий с низким равновесным значением [Ab] 4,5 мл 60 пМ Ab смешивали с 4,5 мл каждого раствора для титрования клеток, разбавляющего конечную концентрацию клеток и Ab пополам. Для условий с высоким равновесным значением [Ab] 200 мкл 1 нМ Ab смешивали с 200 мкл каждого раствора для титрования клеток, разбавляющего конечную концентрацию клеток и Ab пополам. Для каждого равновесного условия образец пустой ячейки, содержащей только среду, и образец без добавления клеток включали для контрольных точек. Инкубирование при равновесных условиях проводили в течение 44 часов при к. т. со встряхиванием.

[364] После 44 часов инкубации супернатанты отделяли от клеточного осадка посредством центрифугирования при 500 x g в течение 5 минут. Супернатанты, полученные при условиях с высоким [Ab], так и с низким [Ab] равновесным значением, затем анализировали с помощью аппарата KinExA 3200.

[365] При каждом из условий для равновесных образцов проводили считывание в двух повторностях с помощью аппарата KinExA. Для образцов с низким равновесным значением [Ab] 4,1 мл каждого образца пропускали в двух повторностях. Для образцов с высоким равновесным значением [Ab] 100 мкл каждого образца пропускали в двух повторностях. Гранулы PMMA (частицы полиметилметакрилата) покрывали Ab козы к Fc человека и последовательно блокировали посредством блокирующего раствора (1X PBS, pH 7,4+10 мг/мл BSA+0,05% азида натрия). Для каждого равновесного образца свободные [Ab] могут быть обнаружены посредством пропускания равновесных образцов через покрытые гранулы с последующей быстрой промывкой подвижным буфером (1X PBS, pH 7,4+1% BSA+0,05% азида натрия). Затем вторичное обнаружение Ab, антитело козы к huIgG (H+L) Dylight 649 проводили через проточную ячейку при 680 нг/мл и 500 мкл за цикл. Сигнал выходного напряжения KinExA затем применяли в программном обеспечении KinExA для расчета K_d . Из графиков с двумя различными исходными общими [Ab] концентрациями получали K_d путем подбора кривой с применением анализа N-кривой в программном обеспечении KinExA Pro (Sapidyne Instruments Inc., Бойсе, Айдахо). 95% доверительный интервал задается как низкая K_d и высокая K_d .

[366] **Таблица 6. Краткое описание аффинности связывания 15D11.1**

	<u>Octet</u>				<u>KinExA</u>	
	KD (M)	kon (1/мс)	kdis (1/с)	KD (1/с)	Kd (nM)	95% CI (nM)
Среднее значение	6,14E-10	3,31E+05	1,89E-04	0,61	125	61 - 255
SD	2,37E-10	1,46E+05	5,90E-05	0,24		

[367] *Обобщение Octet представляет собой среднее значение из 3 экспериментов

[368] **Пример 11. Результаты анализа ELISA в отношении межвидовой реакционной способности и селективности 15D11.1 по отношению к членам семейства лигандов Notch**

[369] 15D11.1 связывается с рекомбинантным Jagged–1 человека и Jagged–1 крысы, но не связывается с Jagged–2, Dll1 или Dll4. Ниже представлено обобщение IC50.

[370] Таблица 7.

	IC50 hJAG1 Fc (нМ)	IC50 hJAG1 His (нМ)	IC50 rJAG1 (нМ)
15D11.1	0,80 (n=3)	0,39 (n=1)	0,51 (n=3)

[371] 15D11.1 тестировали в отношении связывания с рекомбинантными очищенными лигандами Notch с применением стандартного формата анализа ELISA. 15D11.1 связывает Jagged–1 человека и крысы (со значениями IC50, находящимися в диапазоне от 0,3 нМ до 0,9 нМ), но не связывается с Jagged–2, Dll1 или Dll4.

[372] 15D11.1 тестировали в отношении связывания с рекомбинантными очищенными лигандами Notch; Jagged1 человека с Fc (Recombinant Human Jagged 1 Fc chimera – R&D Systems № по кат.:1277–JG–050), Jagged1 человека с His (Human JAG1/Jagged1 His Tag Sino Biological № по кат.: 11648–H08H), Jagged1 крысы с Fc (Recombinant Rat Jagged 1 Fc chimera – R&D Systems – № по кат.:599–JG–050), Jagged2 человека (Recombinant Human Jagged 2 Fc chimera – R&D Systems, № по кат.:1726–JG–050), Jagged2 мыши (Recombinant Mouse Jagged 2 Fc chimera – R&D Systems, № по кат.:4748–JG–050), Delta–like 1 мыши (Recombinant Mouse DLL1 His tag – Sino Biological, № по кат.: 50522–M08H–50), Delta–like 4 человека (Recombinant Human DLL4 His tag – R&D Systems – № по кат.:1506–D4–050) и Delta–like 4 мыши (Recombinant Mouse DLL4 His tag – R&D Systems – № по кат.:1389–D4–050) с применением стандартного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). 1 мкг/мл белка лиганда Notch (как указано) в PBS, pH 7,4 наносили на планшеты для ELISA (Nunc Maxisorp) при 4°C в течение ночи. Планшеты блокировали казеиновым блокатором в PBS (Pierce) в течение одного часа при комнатной температуре. Последовательные 2–кратные разведения 15D11.1

[373] в буфере PBST (буфер PBT (PBS+0,05% (об./об.) Tween 20) с 0,5% (вес/об.)

BSA) добавляли к планшетах и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали с помощью PBST и связывание антител определяли посредством конъюгированного с пероксидазой козьего специфического IgG козы к Fab человека (Sigma). Использовали субстрат TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и считывали коэффициент поглощения при 450 нм с применением стандартного планшет-ридера для ELISA. Коэффициент поглощения наносили на график в зависимости от концентраций 15D11.1 на фиг. 8А и 8В.

[374] Пример 12. Связывание 15D11.1 с клетками 293Т, трансфицированными Jagged–1 человека

[375] 15D11.1 связывается с клетками 293Т, стабильно трансфицированными Jagged–1 человека с EC_{50} 0,29 нМ. Связывание 15D11.1 с исходными клетками 293Т использовали в качестве отрицательного контроля.

[376] Связывание 15D11.1 с Jagged–1 человека оценивали посредством проточной цитометрии с применением клеток 293Т, сконструированных для стабильной экспрессии Jagged–1 человека тем же способом, которым индуцируют Tet. 15D11.1 связывается с клетками 293Т, трансфицированными Jagged–1 человека с EC_{50} 0,29 нМ. См. фиг. 9.

[377] Вкратце, клетки 293Т при ~60% конфлюентности выращивали в течение ночи при 37°C/5% CO₂ в присутствии 1 мкг/мл доксициклина для индуцирования экспрессии Jagged–1 человека. На следующее утро клетки удаляли неферментативным раствором для диссоциации клеток (Gibco), промывали в PBS (Gibco) с добавлением 2% FBS (Hyclone), разбавляли до 1×10⁵ клеток/100 мкл в PBS/2% FBS и разделяли на аликвоты по 1,5 мл в 96-луночные планшеты с глубокими лунками (Nunc) для иммуноокрашивания. Проводили серийные разведения 1:2 15D11.1, находящегося в диапазоне концентрации от 13,2 нМ до 0,026 нМ. 100 мкл титра антител добавляли к 1×10⁵ клеток и инкубировали на льду в течение 1 ч. Клетки промывали 2X посредством PBS/2%FBS и инкубировали с антителом мыши к Fc человека (клон 1.35.1), конъюгированным с dylight 649 с концентрацией (0,1 мкг/мл) в течение дополнительного 1 ч. для обнаружения 15D11.1. После 2 дополнительных промывок клетки пропускали через проточный цитометр BD LSRII с применением канала APC.

[378] Пример 13. Межвидовая реакционная способность 15D11.1 по отношению к клеткам 293Т, трансфицированным Jagged–1 мыши

[379] 15D11.1 связывается с клетками 293Т, стабильно трансфицированными Jagged–1 мыши с EC_{50} 0,36 нМ.

[380] Межвидовую реакционную способность 15D11.1 с Jagged–1 мыши оценивали посредством проточной цитометрии с применением клеток 293Т, сконструированных для стабильной экспрессии Jagged–1 мыши. 15D11.1 связывается с клетками 293Т, трансфицированными Jagged–1 мыши с EC_{50} 0,36 нМ. См. фиг. 10.

[381] Вкратце, клетки 293Т, стабильно экспрессирующие Jagged–1 мыши, удаляли неферментативным раствором для диссоциации клеток (Gibco), промывали в PBS (Gibco) с добавлением 2% FBS (Hyclone), разбавляли до 1×10⁵ клеток/100 мкл в PBS/2% FBS и

разделяли на аликвоты по 1,5 мл в 96-луночные планшеты с глубокими лунками (Nunc) для иммуноокрашивания. Проводили серийные разведения 1:2 15D11.1, находящегося в диапазоне концентрации от 13,2 нМ до 0,026 нМ. 100 мкл титра антител добавляли к 1×10^5 клеток и инкубировали на льду в течение 1 ч. Клетки промывали 2X посредством PBS/2%FBS и инкубировали с антителом мыши к Fc человека (клон 1.35.1), конъюгированным с dylight 649 с концентрацией (0,1 мкг/мл) в течение дополнительного 1 ч. для обнаружения 15D11.1. После 2 дополнительных промывок клетки пропускали через проточный цитометр BD LSRII с применением канала APC.

[382] Пример 14. Связывание 15D11.1 с клетками 293Т, трансфицированными Jagged–1 крысы

[383] Клетки 293Т временно трансфицировали посредством Jagged–1 крысы и связывание 15D11.1 оценивали с помощью проточной цитометрии. 15D11.1 связывается с клетками, трансфицированными Jagged–1 крысы с EC_{50} 0,25 нМ. Связывание 15D11.1 с исходными клетками 293Т использовали в качестве отрицательного контроля.

[384] Межвидовую реакционную способность 15D11.1 с Jagged–1 крысы оценивали посредством проточной цитометрии с применением клеток 293Т, временно трансфицированных с помощью Jagged–1 крысы. 15D11.1 связывается с клетками 293Т, трансфицированными Jagged–1 крысы с EC_{50} 0,25 нМ. См. фиг. 11.

[385] Вкратце, клетки 293Т при ~60% конфлюентности временно трансфектировали посредством 8% (об./об.) VacMam/Jagged1 крысы в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующее утро клетки удаляли неферментативным раствором для диссоциации клеток (Gibco), промывали в PBS (Gibco) с добавлением 2% FBS (Hyclone), разбавляли до 1×10^5 клеток/100 мкл в PBS/2% FBS и разделяли на аликвоты по 1,5 мл в 96-луночные планшеты с глубокими лунками (Nunc) для иммуноокрашивания. Проводили серийные разведения 1:2 15D11.1, находящегося в диапазоне концентрации от 13,2 нМ до 0,026 нМ. 100 мкл титра антител добавляли к 1×10^5 клеток и инкубировали на льду в течение 1 ч. Клетки промывали 2X посредством PBS/2%FBS и инкубировали с антителом мыши к Fc человека (клон 1.35.1), конъюгированным с dylight 649 с концентрацией (0,1 мкг/мл) в течение дополнительного 1 ч. для обнаружения 15D11.1. После 2 дополнительных промывок клетки пропускали через проточный цитометр BD LSRII с применением канала APC.

[386] Пример 15. Титрование дозы mAb 15D11.1 к Jagged–1 в ходе анализа с совместным культивированием в отношении активации Notch2 человека, индуцированной Jagged–1 человека

[387] mAb 15D11.1 к Jagged–1 противодействует активации Notch человека, индуцированной Jagged–1 человека, в экспериментах с совместным культивированием дозозависимым образом с IC_{50} 1,69 нМ (среднее значение IC_{50} 2,31 нМ +/- 0,56 стандартное отклонение, из n=4 экспериментов). См. фиг. 12.

[388] Клетки 293Т, сконструированные для стабильной экспрессии Jagged–1 человека тем же способом, которым индуцируют доксициклин, совместно культивировали

с клетками SK-MEL-28, стабильно трансфицированными с помощью Notch-восприимчивого репортера люциферазы светлячка (12xCSL) (pGL4, Promega), с увеличивающимися количествами mAb 15D11.1 к Jagged-1 (66,7 нМ–0,131 нМ). Клетки SK-MEL-28 характеризовали посредством проточной цитометрии и qPCR и демонстрировали, что они эндогенно экспрессировали высокий уровень рецептора Notch 2 (данные не показаны). Эндогенную экспрессию других членов семейства Notch не выявляли (Notch 1 и Notch 3). 15D11.1 был способен ингибировать сигнальный путь Notch, индуцированный Jagged-1, дозозависимым образом со средним IC_{50} 2,31 нМ (+/- 0,56 стандартное отклонение) из n=4 экспериментов.

[389] Вкратце, клетки 293T/Jagged-1 человека, индуцированные Tet, инкубировали с доксициклином (1 мкг/мл) в течение ночи при 37°C/5% CO₂ для индукции экспрессии Jagged-1 человека. На следующий день индуцированные доксициклином клетки 293T/Jagged-1 человека (2×10⁴) совместно культивировали с клетками SK-MEL-28 (2×10⁴), стабильно экспрессирующими репортер люциферазы светлячка 12xCSL (pGL4, Promega), в присутствии увеличивающихся количеств mAb 15D11.1 к Jagged-1 (разбавления 1:2, находящиеся в диапазоне 66,7 нМ–0,131 нМ) в 96-луночном планшете для тканевых культур. Клетки совместно культивировали на протяжении ночи в течение ~18 ч. при 37°C/5%CO₂. На следующий день равный объем One-Glo (Promega) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали при к. т. в течение 10 мин. с осторожным встряхиванием и считывали на люминометре.

[390] Пример 16. Титрование дозы mAb 15D11.1 к Jagged-1 в ходе анализа с совместным культивированием в отношении активации Notch1 мыши, индуцированного Jagged-1 мыши

[391] mAb 15D11.1 к Jagged-1 противодействует активации Notch 1 мыши, индуцированного Jagged-1 мыши, в экспериментах по совместному культивированию дозозависимым образом с IC_{50} 7,72 нМ (среднее значение IC_{50} 9,0 нМ +/- 1,47 стандартное отклонение, из n=3 экспериментов).

[392] Клетки 293T, сконструированные для стабильной экспрессии Jagged-1 мыши, совместно культивировали с клетками 293T, стабильно трансфицированными с помощью Notch1 мыши и Notch-восприимчивого репортера люциферазы светлячка (7xCSL) с увеличивающимися количествами mAb 15D11.1 к Jagged-1 (667 нМ–1,3 нМ). 15D11.1 был способен ингибировать сигнальный путь Notch1 мыши, индуцированный Jagged-1 мыши, дозозависимым образом со средним значением IC_{50} 7,72 нМ (+/- 1,47 стандартное отклонение) из n=3 экспериментов. См. фиг. 13.

[393] Вкратце, клетки 293T/Jagged-1 мыши (2×10⁴) совместно культивировали с клетками 293T/Notch1 мыши (2×10⁴), стабильно экспрессирующими Notch-восприимчивый репортер люциферазы светлячка 7xCSL, в присутствии увеличивающихся количеств mAb 15D11.1 к Jagged-1 (разбавления 1:2, находящиеся в диапазоне 667 нМ–1,3 нМ) в 96-луночном планшете для культивирования тканей. Клетки совместно культивировали на протяжении ночи в течение ~18 ч. при 37°C/5%CO₂. На следующий

день равный объем One-Glo (Promega) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали при к. т. в течение 10 мин. с осторожным встряхиванием и считывали на люминометре.

[394] Пример 17. Титрование дозы mAb 15D11.1 к Jagged-1 в нестимулированных и стимулированных культурах бронхосфер

[395] Влияние обработки mAb (15D11.1) к Jagged-1 на дифференциацию эпителиальных клеток дыхательных путей оценивали с применением 3D-культур бронхосфер, полученных из нормальных здоровых или пораженных заболеванием эпителиальных клеток бронхов (CF & COPD), либо нестимулированных, либо стимулированных с помощью IL-13 (1 нг/мл) в течение 7 дней в присутствии увеличивающихся концентраций 15D11.1 (66,7 нМ–0,131 нМ). 15D11.1 уменьшает экспрессию маркера секреторных клеток (SCGB1A1), бокаловидных клеток (MUC5AC) и активации Notch (NRARP) дозозависимым образом после 7 дней обработки культур, стимулированных или нестимулированных IL-13 (1 нг/мл), и увеличивает экспрессию маркера реснитчатой эпителиальной клетки (DNAI2) в нестимулированных культурах. Результаты были подобны в клетках нормального здорового донора и клетках пораженного заболеванием донора (CF и COPD). Уровни экспрессии выражали относительно гена домашнего хозяйства HPRT1.

[396] Нормальные эпителиальные клетки бронхов человека и эпителиальные клетки бронхов с хронической обструктивной болезнью легких (COPD) приобретали у Lonza. Эпителиальные клетки бронхов с кистозным фиброзом (CF) и среды для дифференциации (UNC ALI среды) получали из Университета Северной Каролины в Чапел–Хилл (UNC). 3D-культивирование бронхосфер с применением клеток 2 пассажа проводили как описано ранее (см. Danahay et al). Вкратце, эпителиальные клетки бронхов человека P1 размножали в среде BEGM (Lonza) в колбе для культивирования тканей T75. После достижения конфлюентности клетки трипсинизировали, ресуспендировали в средах для дифференциации UNC+3% матригеля (Corning) и размещали с плотностью 6000 клеток/лунка на 60 мкл отвердевшей среды UNC ALI, содержащей 25% матригеля, в 96-луночные планшеты с плоским дном. Бронхосферы выращивали в течение 7 дней с повторной подпиткой три раза в неделю. В день 7 культуры стимулировали дополнительно +/- IL-13 (при 1 нг/мл) + 15D11.1 в течение 7 дней. Свежие среды (с или без обработки) меняли через день и дополняли свежим цитокином и обработкой. В день 14 органеллы лизировали и обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя платформы Affymetrix QuantiGene для изучения маркеров секреторных клеток (SCGB1A1; фиг. 14A, 14E, 14I, 15A, 15E и 15I), бокаловидных клеток (MUC5AC; фиг. 14B, 14F, 14J, 15B, 15F и 15J), реснитчатых клеток (DNAI2 (фиг. 14C, 14G, 14K, 15C, 15G и 15K) и FOXJ1) и маркера активации Notch (NRARP; фиг. 14D, 14H, 14L, 15D, 15H и 15L).

[397] mAb 15D11.1 к Jag1 уменьшает экспрессию маркера секреторных клеток (SCGB1A1; фиг. 14A, E и I), бокаловидных клеток (MUC5AC; фиг. 14B, F и J) и активации Notch (NRARP; фиг. 14D, H и L), при этом демонстрируя увеличение экспрессии маркера

реснитчатых клеток (DNAI2; фиг. 14C, G и K) дозозависимым образом после 7 дней обработки в нестимулированных культурах бронхосферы, полученных из нормальных (фиг. 14A–D) или пораженных заболеванием (CF (фиг. 14E–H) и COPD (фиг. 14I–L)) эпителиальных клеток бронхов. Уровни экспрессии выражали относительно гена домашнего хозяйства HPRT1.

[398] mAb 15D11.1 к Jag1 уменьшает экспрессию маркера секреторных клеток (SCGB1A1; фиг. 15A, E и I), бокаловидных клеток (MUC5AC; фиг. 15B, F и J) и активации Notch (NRARP; фиг. 14D, H и L) дозозависимым образом после 7 дней обработки в культурах бронхосфер, стимулированных IL–13 (1 нг/мл), полученных из нормальных или пораженных заболеванием (CF и COPD) эпителиальных клеток бронхов. Уровни экспрессии выражали относительно гена домашнего хозяйства HPRT1.

[399] Экспрессию генов в 3D–культурах бронхосфер количественно определяли с применением анализа QuantiGene Multiplex (Affymetrix). 30 мкл лизирующего раствора Affymetrix с протеиназой К добавляли в каждую лунку с 60 мкл бронхосфер в соотношении 2:1 и инкубировали при 55°C в течение 30 мин. в соответствии с Danahay et al., 2015. 80 мкл образца лизатов переносили в 96–луночный планшет, предоставленный Affymetrix, содержащий 20 мкл раствора для гибридизации с лизирующей смесью, протеиназой К, блокирующим реагентом, набором специфических зондов и набором гранул O/N при 55°C. Наборы зондов содержали гены–мишени: DNAI2(NM_023036); FOXA3(NM_0044971); FOXJ1(NM_001454); HPRT1(NM_000194); MUC5AC(NM_017511); MUC5B(NM_002458); NOTCH3(NM_000435); NRARP(NM_001004354); SCGB1A1(NM_003357) от Affymetrix Panel M17012501 или DNAI2(NM_023036); FOXJ1(NM_001454); HPRT1(NM_000194); MUC5AC(NM_017511); MUC5B(NM_002458); NRARP(NM_001004354); SCGB1A1(NM_003357); ANO1(NM_018043); SLC26A4(NM_000441) от Affymetrix Panel M18013101. На следующий день раствор для промывания, раствор предварительного усиления, раствор усиления и раствор метки зонда стрептавидин–фикоэритрин (SAPE) получали с применением инструкций производителя. Планшеты промывали на устройстве для промывки с магнитной пластиной три раза между каждой стадией. Каждую лунку считывали на приборе FlexMap 3D (Luminex). Чтобы гарантировать то, что уровни были схожими во всех лунках, данные нормализовали по отношению к гену домашнего хозяйства HPRT1.

[400] Пример 18. Профилактическая дозировка антитела к Jag1, которая ингибирует экспрессию гена NRARP сигнального пути Notch и маркерного гена Muc5ac бокаловидной клетки в модели метаплазии бокаловидных клеток мыши, индуцированной посредством интратрахеальной доставки IL–13

[401] Для интратрахеального (ИТ) введения IL–13, мышей C57Bl/6 анестезировали с помощью 3–5% изофлурана до эффекта и дозировали с применением затупленного наконечника пипетки для внесения геля, осторожно введенного в трахею через полость рта. Мышей подвешивали на доске за резец с применением нити для сшивания раны, что необходимо для визуализации трахеи. 10 микрограмм IL–13 мыши вводили в 50

микролитров солевого раствора ежедневно в течение трех дней. В день 4 легкие собирали для РНК. Использовали пять групп мышей. Трем группам вводили интратрахеально солевой раствор и предварительно обрабатывали один раз в 1 день без ничего (Naïve), 100 мг/кг антитела изотипического контроля (Iso) или 100 мг/кг 15D11.1. Двум группам вводили интратрахеально PL-13 и предварительно обрабатывали один раз в день 1 с помощью 100 мг/кг антитела изотипического контроля (Iso) или 100 мг/кг 15D11.1.

[402] А) Обеспечивается понижающая регуляция гена *Nrarp* сигнального пути Notch в легких мышей при интратрахеальной стимуляции солевым раствором или PL-13 во время обработки с помощью 15D11.1. В) Повышается содержание маркерного гена бокаловидной клетки *Muc5ac* в легких мыши при интратрахеальной стимуляции PL-13 и содержание снижается при обработке 15D11.1. См. фиг. 16А и В.

[403] Пример 19. Профилактическая дозировка антитела к Jag1, которая приводит к реснитчатому фенотипу эпителиальной клетки дыхательных путей и ингибирует метаплазию бокаловидных клеток в модели астмы, индуцированной овальбумином.

[404] Ремоделирование легочных дыхательных путей мыши, индуцированное аллергеном, (метаплазия бокаловидных клеток) измеряли в модели астмы у мыши, индуцированной овальбумином. В данном исследовании использовали пять групп по восемь мышей (40 мышей всего). Взрослых самок мышей Balb/c (старше 8 недель) сенсibilizировали и стимулировали посредством внутрибрюшинной (i.p.) инъекции 0,2 мл 2% геля гидроксида алюминия (ALUM) (Serva Electrophoretics, 12261, Гейдельберг, Германия) с использованием или без использования 10 мкг антигена овальбумина (OVA) (Worthington Biochemical Corporation, LS003054, Лейквуд, Нью-Джерси) в дни 0 и 14. Группу А сенсibilizировали и стимулировали с помощью i.p. инъекции 0,2 мл раствора одного мл 0,9% солевого раствора в 50 мл геля ALUM. Группы В, С, D и E сенсibilizировали и стимулировали с помощью i.p. инъекции 0,2 мл раствора 2,55 мг OVA, растворенного в одном мл 0,9% солевого раствора в 50 мл геля ALUM. Группы В, С, D и E подвергали ингаляциям распыленного OVA, чтобы вызвать антиген-индуцированное воспаление легкого и метаплазию бокаловидных клеток в легких. Для стимуляции распыленным OVA мышей помещали в коробку из плексигласа и аэрозольный OVA распыляли внутрь коробки посредством распылителя (PARI Respiratory Equipment, распылитель LC STAR и компрессор Proneb Ultra II, Мидлоттиан, Вирджиния), заполненного 1% овальбумином в солевом растворе (0,01 г/мл), в течение 20 минут в дни 21, 22 и 23. В день 26 проводили 20-минутную стимуляцию распыленным OVA с использованием 5% овальбумина в солевом растворе. Группу А подвергали ингаляции распыленным солевым раствором без OVA. Группам А и В вводили антитело изотипического контроля (100 мг/кг, PL-35304) и группам С (1 мг/кг), D (10 мг/кг) и E (100 мг/кг) вводили mAb 15D11.1 человека к <Jag-1> человека (PL-42541).мг/кг). Всем группам дозы вводили внутривенно в хвостовую вену в объеме 5 мл/кг в дни 0, 7, 14 и 20. В день 27 мышей подвергали эвтаназии и легкие наполняли 10% нейтральным

забуференным формалином через трахеальные канюли. Наполненные легкие погружали в формалин на по меньшей мере 24 ч. После помещения в парафиновые блоки легкие разрезали (5 мкм) и размещали на предметных стеклах. Срезы легких окрашивали Шифф–йодной кислотой (PAS) для оценки содержания муцина.

[405] Фиг. 17A) Двойное иммунофлюоресцентное окрашивание применяли для визуализации содержания секреторных и реснитчатых клеток в эпителии дыхательных путей. Несенсибилизированные и сенсибилизированные/стимулированные OVA дыхательные пути имеют преимущественно фенотип секреторной клетки, при этом более реснитчатый фенотип клетки наблюдали у сенсибилизированных/стимулированных OVA мышей, которых обрабатывали 15D11.1. Фиг. 17B) Иллюстративные изображения эпителия дыхательных путей с муцином, окрашенным PAS. Фиг. 17C) Содержание муцина, измеренное посредством стереологической методики, в эпителии дыхательных путей уменьшается дозозависимым образом посредством обработки 15D11.1.

[406] Пример 20. Терапевтическая дозировка нейтрализующего Ab к Jag1 в модели астмы, индуцированной овальбумином, ингибирует экспрессию гена секреторной клетки

[407] В модели астмы OVA у мышей, пяти группам мышей дозы вводили в день 22 (терапевтическая дозировка). Одну группу не сенсибилизировали к OVA и вводили 100 мг/кг антитела изотипического контроля (солевой раствор–Iso). Одну группу сенсибилизировали/стимулировали OVA и вводили 100 мг/кг антитела изотипического контроля (Iso). Три группы мышей сенсибилизировали/стимулировали OVA и вводили 10, 30 или 100 мг/кг 15D11.1

[408] Фиг. 18A) 15D11.1 ингибировали экспрессию маркера секреторных клеток гена *Scgb1a1* в ткани легких мыши дозозависимым образом ED₅₀ с дозами 10–30 мг/кг. 15D11.1 также в значительной степени ингибирует маркеры бокаловидных клеток генов фиг. 18B) *Muc5ac*, фиг. 18C) *Muc5b* и фиг. 18D) и генов *Nrarp* сигнального пути Notch.

[409] Пример 21. Обработка антителом к Jag1, которая уменьшает слизистую обструкцию дыхательных путей в модели слизисто–обструктивного заболевания легкого у трансгенной мыши b–ENaC

[410] У трансгенных (Tg) мышей b–ENaC развивается слизистая обструкция дыхательных путей (Livraghi–Butrico, A., et al., 2012, Genetically determined heterogeneity of lung disease in a mouse model of airway mucus obstruction. *Physiol Genomics*, 44: 470–484). 100 мг/кг 15D11.1 или 100 мг/кг антитела изотипического контроля вводили раз в неделю в течение трех недель трансгенным (Tg) мышам b–ENaC и контрольным особям дикого типа одного помета. Легкие собирали через четыре недели после первой дозы антитела и заключали в парафин, разрезали и окрашивали с помощью PAS для слизи. Тяжесть патологии легкого оценивали полуколичественно по шкале с диапазоном от 0 до 3 для оценки слизистой пробки дыхательных путей: 0 нормальные легкие, 1 скудное количество PAS–положительного материала, выстилающего эпителий в средних/крупных дыхательных путях, 2 умеренное количество PAS–положительного материала и не более 1

дыхательного пути среднего размера с обструкцией, 3 среднее количество PAS-положительного материала и более 1 дыхательного пути среднего размера с обструкцией.

[411] Фиг. 19А) Иллюстративные изображения эпителия дыхательных путей с муцином, окрашенным PAS. Фиг. 19В) Размер слизистой пробки в легких уменьшали с помощью обработки 15D11.1.

[412] Пример 22. Дозировка антитела к Jag1 ингибирует уменьшение содержания муцина в дыхательном эпителии обезьян

[413] 4 еженедельные дозы 15D11.1 50 мг/кг SC вводили яванским макакам. В день 28 после первой дозы обезьян умерщвляли и легкие обрабатывали и окрашивали с помощью PAS для оценки содержания муцина.

[414] Иллюстративные изображения эпителия дыхательных путей яванских макак с муцином, окрашенным с помощью PAS. 15D11.1 уменьшает содержание муцина (т. е. число бокаловидных клеток) в дыхательном эпителии (фиг. 20D–F) по сравнению с введением обезьянам только среды–носителя (фиг. 20A–C).

[415] Пример 23. Фармакокинетика антитела 15D11.1

[416] Фармакокинетический профиль различных уровней дозы антитела 15D11.1 после однократной внутривенной (IV) или подкожной (SC) инъекции оценивали у мышей BALB/c и яванских макак. Образцы сыворотки крови собирали и анализировали концентрации антитела с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

[417] Клиренс антитела 15D11.1 после однократного внутривенного или подкожного введения различных доз антитела (фиг. 21А) мышам и (фиг. 21В) яванским макакам. Профили клиренса у яванских макак проявляют мишень–опосредованный характер при дозах менее 10 мг/кг.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта с состоянием, связанным с заболеванием легкого, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антиген-связывающего белка, который специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью Jagged1.
2. Способ по п. 1, где субъект представляет собой млекопитающее.
3. Способ по п. 1 или п. 2, где субъект представляет собой человека.
4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где введение осуществляют посредством распыления.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где введение осуществляют посредством подкожной инъекции.
6. Выделенный антиген-связывающий белок, который специфически связывается с полипептидом Jagged1.
7. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 6, где Jagged1 человека имеет последовательность, содержащую SEQ ID NO: 353.
8. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 6 или п. 7, где антиген-связывающий белок представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, мультиспецифическое антитело или фрагмент такого антитела.
9. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 8, где фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент.
10. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 8, где антиген-связывающий белок представляет собой антитело человека.
11. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 8, где антиген-связывающий белок представляет собой моноклональное антитело.
12. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 10 или п. 11, где антиген-связывающий белок относится к типу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
13. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 12, где антиген-связывающий белок относится к типу IgG1 или IgG2.
14. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 8, где антиген-связывающий белок соединен с группой мечения.
15. Выделенный антиген-связывающий белок по п. 8, где антиген-связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент, и где антитело содержит CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124 и 130; CDRL2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125 и 131; CDRL3 содержит последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126 и 132; CDRH1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256 и 262; CDRH2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 137, 143, 149, 155, 161, 167, 173, 179, 185, 191, 197, 203, 209, 215, 221, 227, 233, 239, 245, 251, 257 и 263; и CDRH3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258 и 264.

16. Выделенный антиген–связывающий белок по п. 8, где антиген–связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент, и где антитело содержит CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где каждая CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 и SEQ ID NO: 144; SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 150; SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 и SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162; SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 174; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 180; SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 и SEQ ID NO: 186; SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191 и SEQ ID NO: 192; SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 210; SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215 и SEQ ID NO: 216; SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 и SEQ ID NO: 222; SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227 и SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 и SEQ ID NO: 234; SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239 и SEQ ID NO: 240; SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245 и SEQ ID NO: 246; SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 и SEQ ID NO: 252; SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 256 SEQ ID NO: 257 и SEQ ID NO: 258; и SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 263 и SEQ ID NO: 264.

17. Выделенный антиген–связывающий белок по п. 8, где антиген–связывающий

белок представляет собой антитело или его фрагмент, и где антитело или его фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 331, 335, 339, 343, 347, и 351, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 268, 272, 276, 280, 284, 288, 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336, 340, 344, 348 и 352.

18. Выделенный антиген–связывающий белок по п. 8, где антиген–связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент, и где антитело или его фрагмент содержат комбинацию переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 267, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 268; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 271, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 272; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 275, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 276; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 279, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 280; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 283, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 284; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 287, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 288; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 291, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 292; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 295, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 296; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 299, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 300; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 303, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 304; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 307, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 308; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 311, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 312; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 315, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 316; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 319, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 320; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 323, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 324; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 327, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 328; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 331, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 332; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 335, и переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 336; переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID

NO: 339, и варибельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 340; варибельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 343, и варибельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 344; варибельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 347, и варибельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 348; и варибельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 351, и варибельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 352.

19. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из пп. 15–18.

20. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 19, где молекула нуклеиновой кислоты является функционально связанной с регуляторной последовательностью.

21. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 20.

22. Клетка–хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 21.

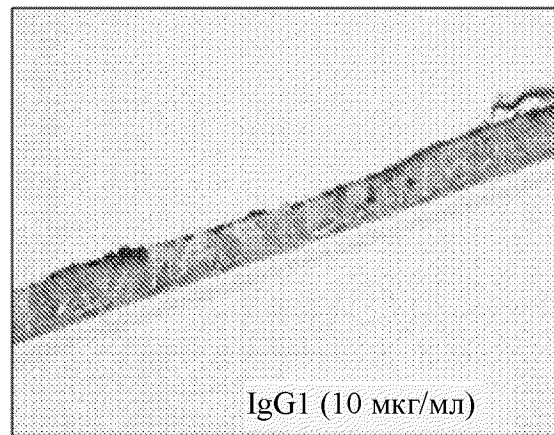
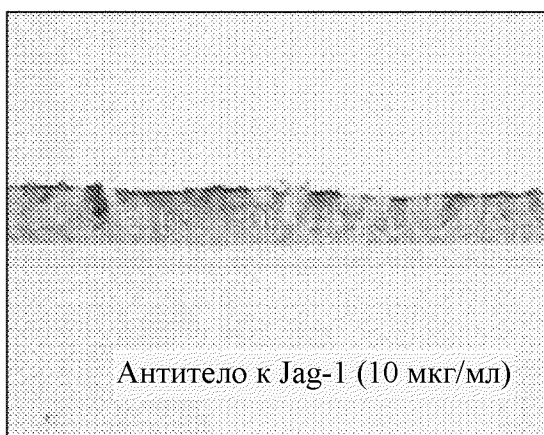
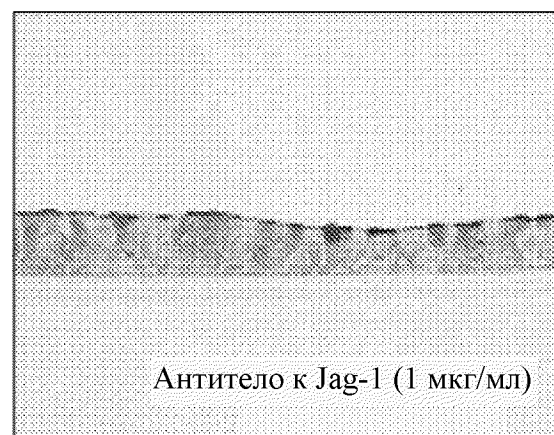
23. Антитело или его фрагмент, продуцируемые клеткой–хозяином по п. 22.

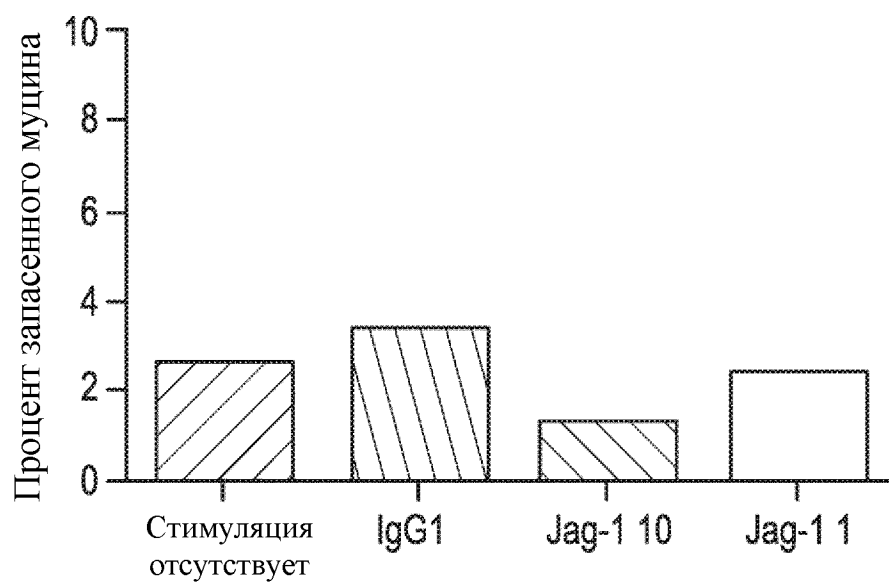
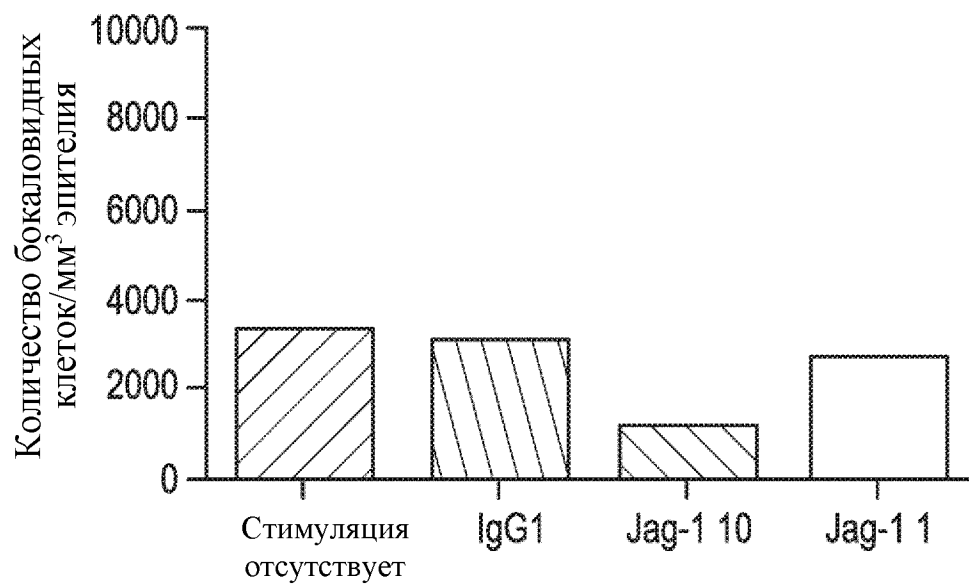
24. Способ получения антитела или его фрагмента по любому из пп. 15–18, включающий стадию получения антитела или его фрагмента из клетки–хозяина, которая секретирует антитело.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно антитело или его фрагмент по любому из пп. 15–18 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

26. Выделенный антиген–связывающий белок, который конкурирует за связывание с Jagged1 человека с антителом или его фрагментом по любому из пп. 15–18.

По доверенности

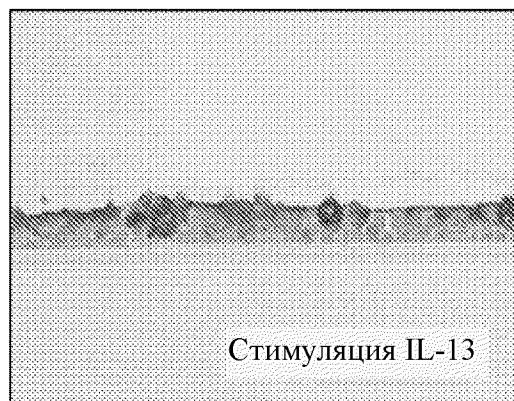
ФИГ. 1А**ФИГ. 1В****ФИГ. 1С****ФИГ. 1D**

ФИГ. 1Е**ФИГ. 1F**

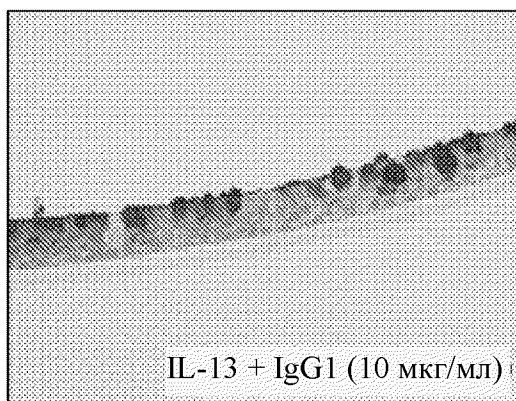
ФИГ. 2А



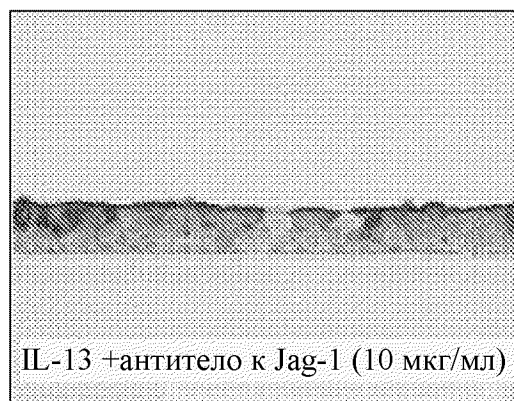
ФИГ. 2В



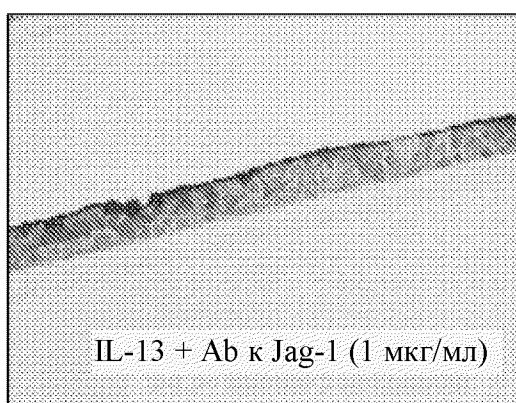
ФИГ. 2С



ФИГ. 2D

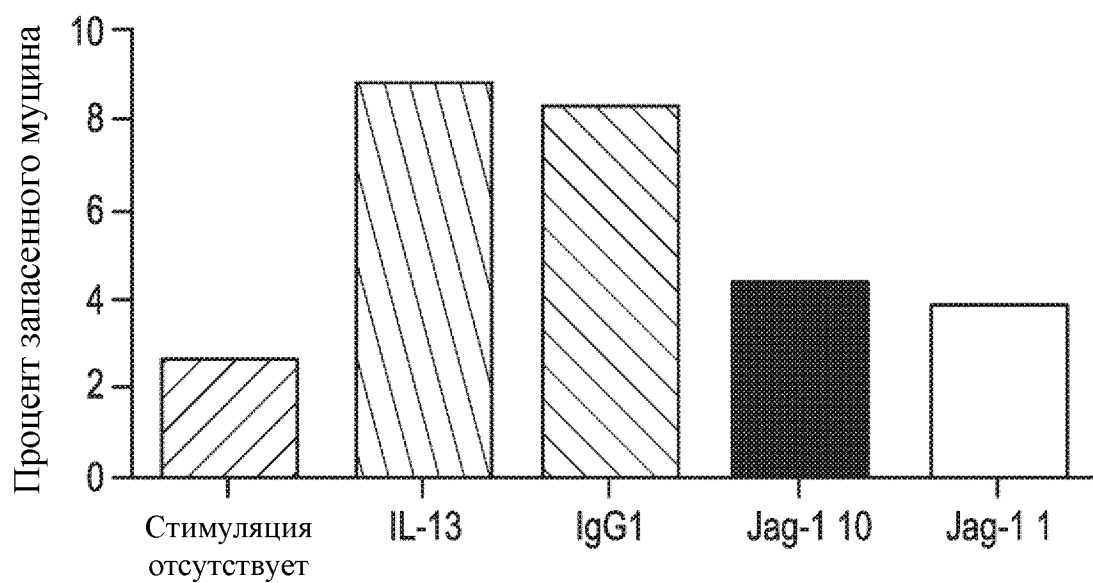


ФИГ. 2Е

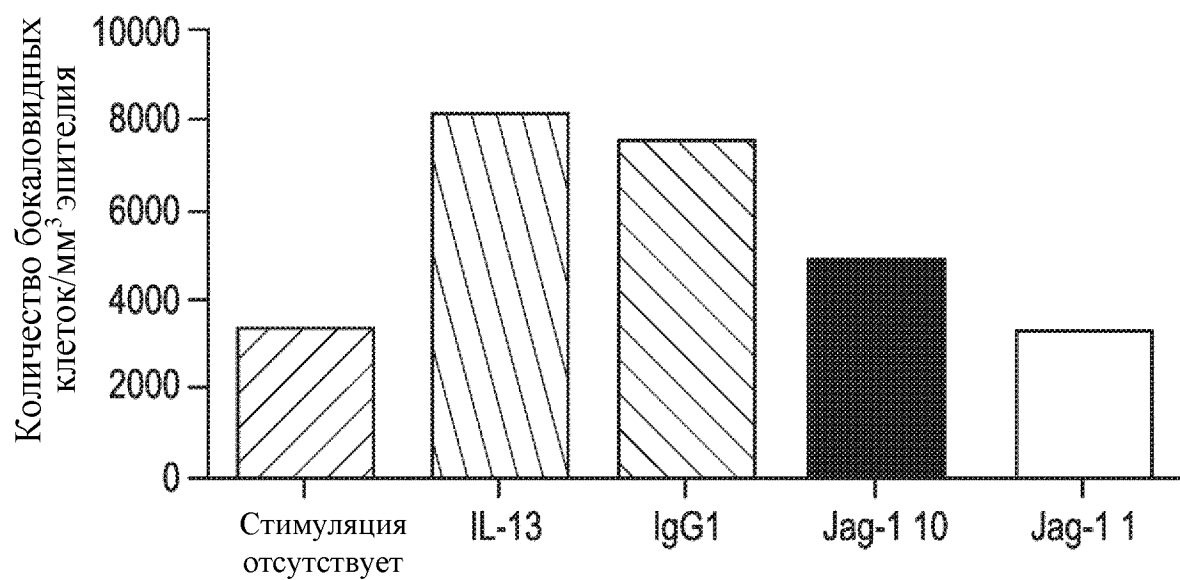


4/32

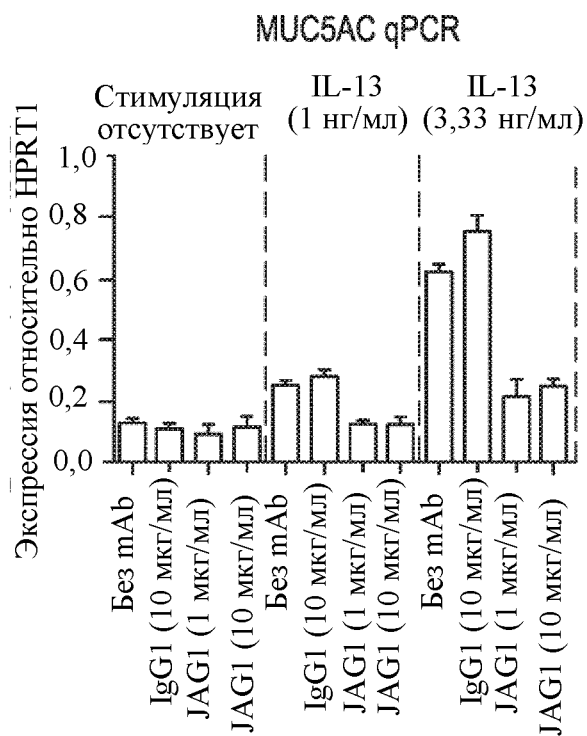
ФИГ. 2F



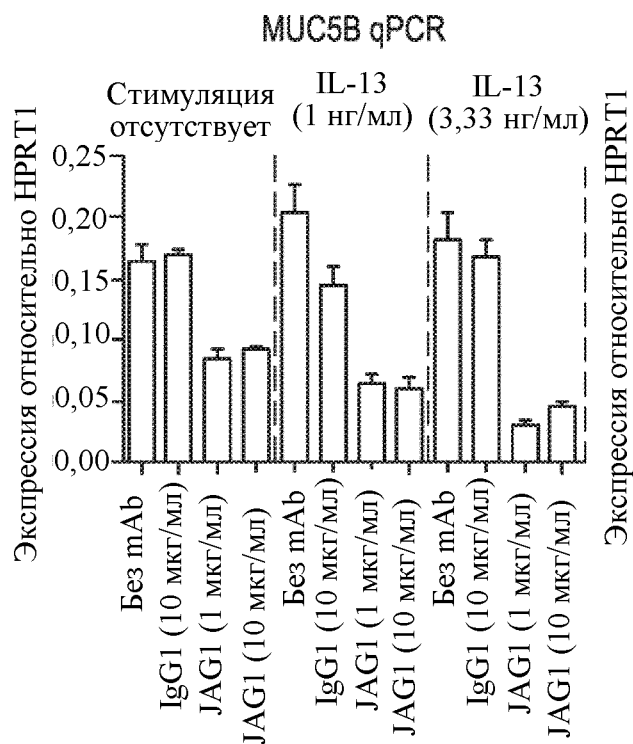
ФИГ. 2G



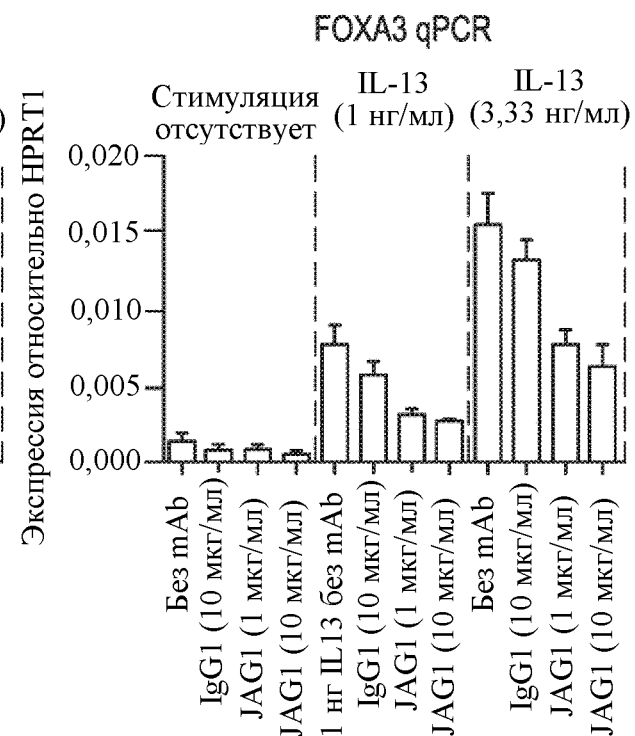
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



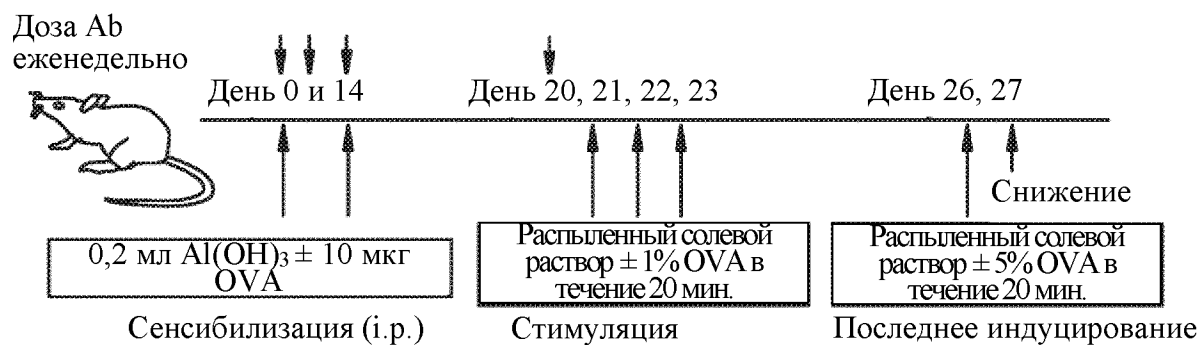
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D

*Зонд HPRT Набор праймеров для HPRT	Последовательность 5'-/56-FAM/TCCAAAGAT/ZEN/GGTCAAGGTCGCAAG/3IABkFQ/-3' 5'-ACTTCGTGGGGTCCTTTTC-3' 5'-CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3'
**Зонд MUC5AC Набор праймеров для MUC5AC	Последовательность 5'-/56-FAM/CGTTTGACG/ZEN/GGAAGCAATACACGG/3IABkFQ/-3' 5'-TACCTGCTCTGTGCTTGGAG-3' 5'-AGGGCTTGGTCAGCACATA-3'
*Зонд MUC5B Набор праймеров для MUC5B	Последовательность 5'-/56-FAM/AACCCCGTA/ZEN/GAAGGTGCCATTGT/3IABkFQ/-3' 5'-CCAGAGAGGCAGGTACACAT-3' 5'-GCAGACCTCAGCTGTGTT-3'

ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



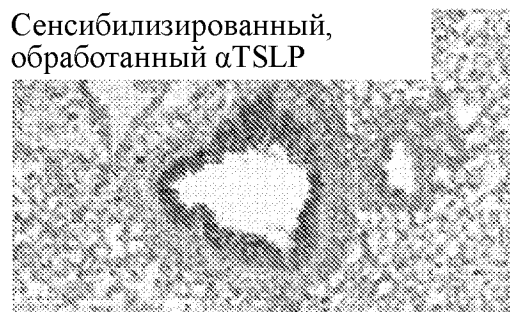
ФИГ. 4С



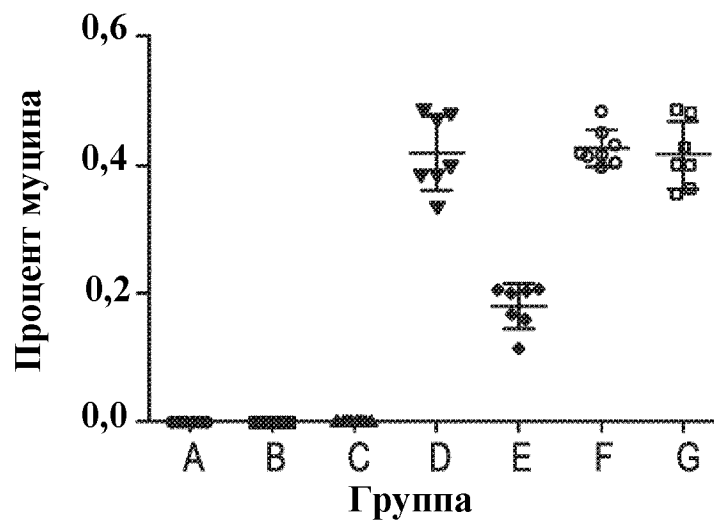
ФИГ. 4D



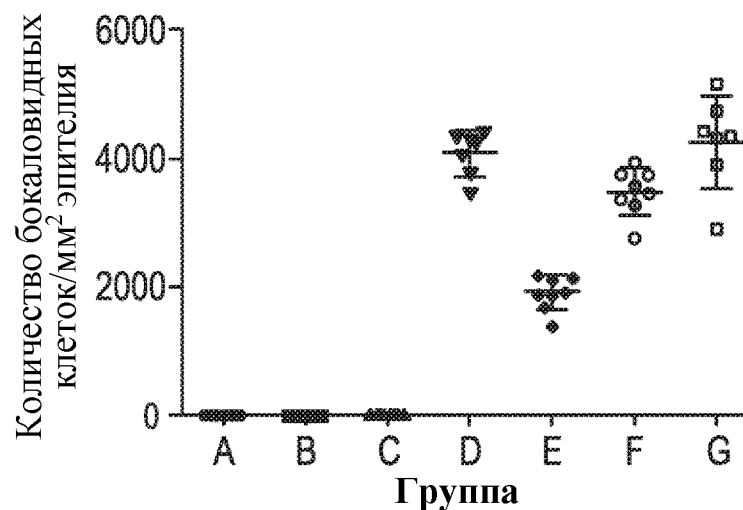
ФИГ. 4Е



ФИГ. 4F



ФИГ. 4G



Экспериментальная группа Лекарственное средство

Группа А – солевой раствор/среда-носитель в виде солевого раствора

Группа В – солевой раствор/солевой раствор Jag1 (80 мг/кг)

Группа С – солевой раствор/солевой раствор изотипического контроля (80 мг/кг)

Группа D – OVA/OVA Среда-носитель

Группа E – OVA/OVA Jag1

Группа F – OVA/OVA Изотипический контроль

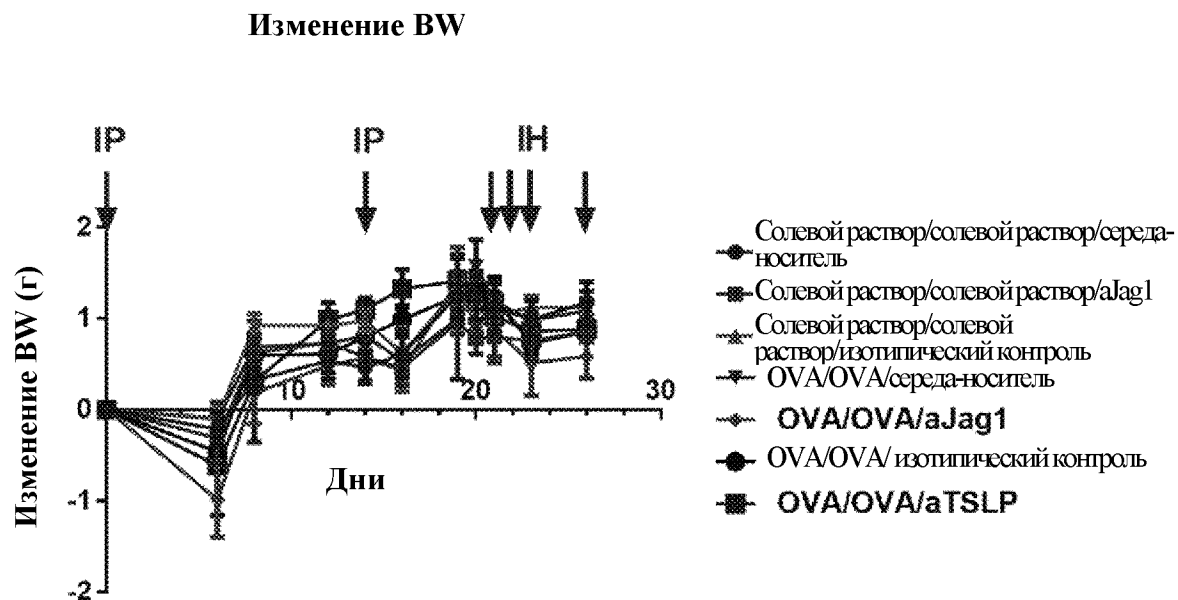
Группа G – OVA/OVA aTSLP (20 мг/кг)

ФИГ. 5А

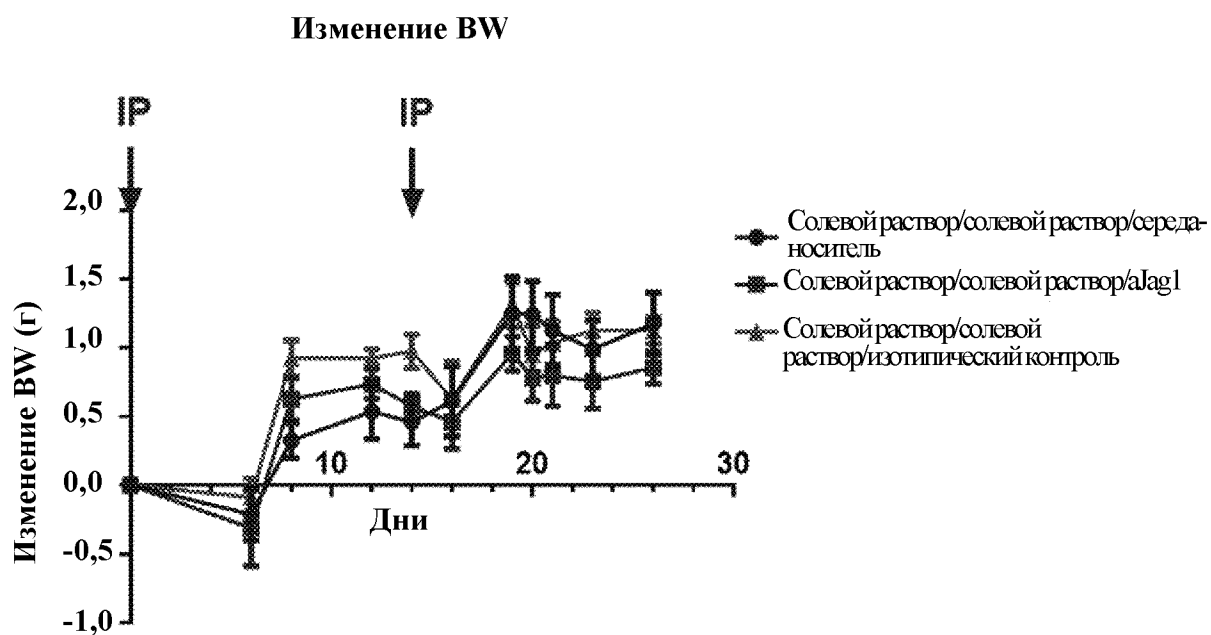
Иммунизация (IP) в день 0 и 14

Введение Ab (IV) в день 0, 7, 14 и 20

Стимуляция OVA (IH) в день 21, 23, 24 и 26

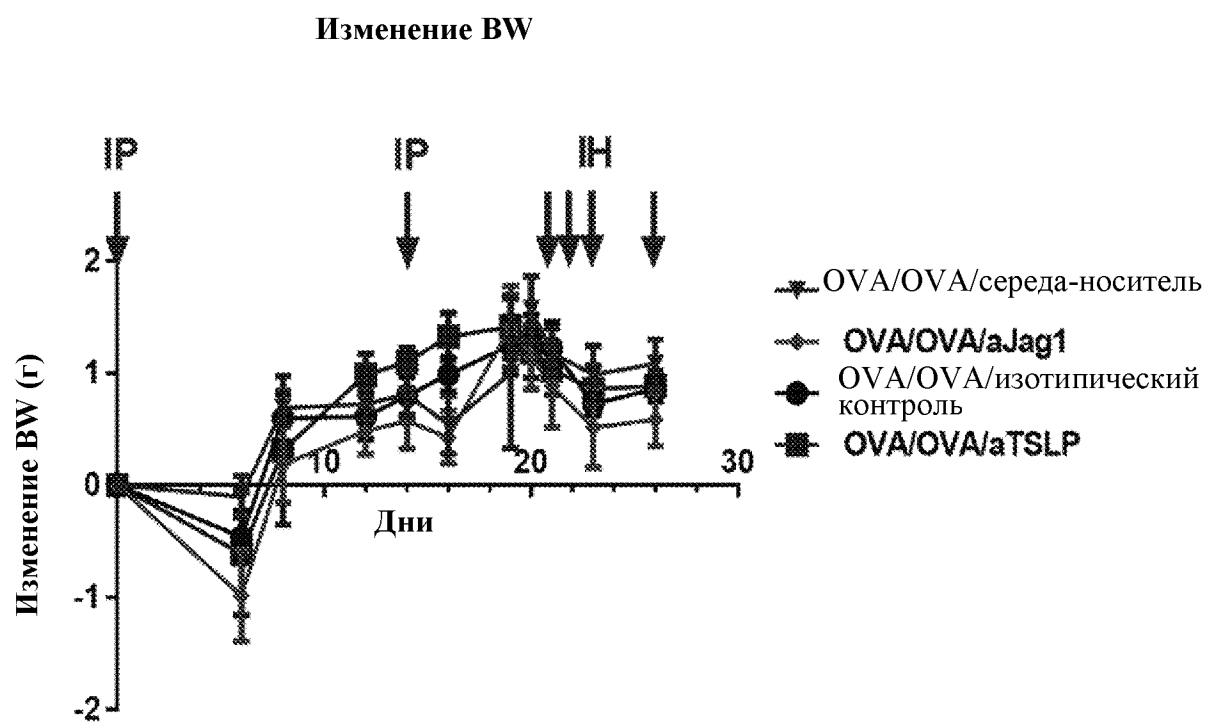


ФИГ. 5В



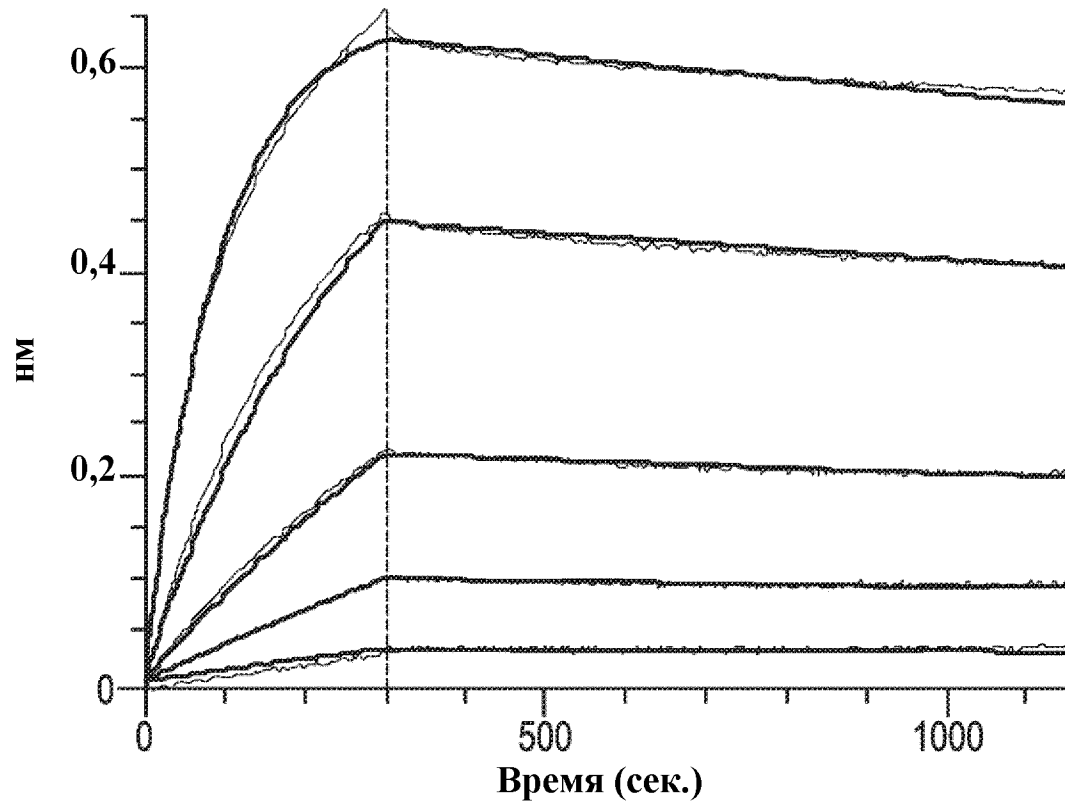
10/32

ФИГ. 5С



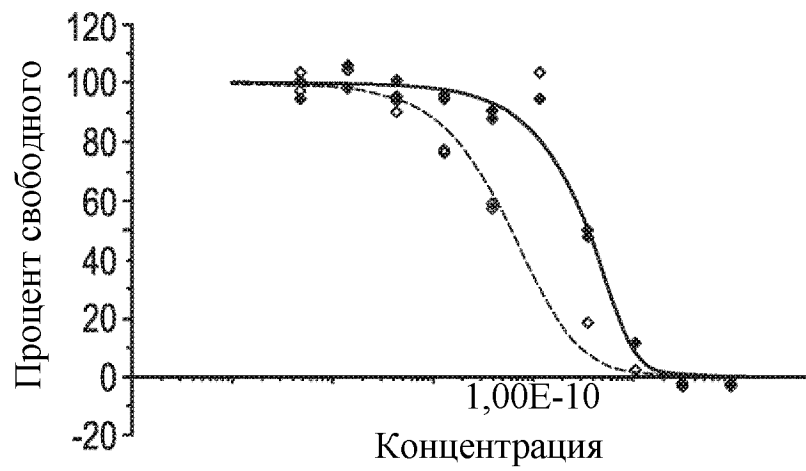
11/32

ФИГ. 6

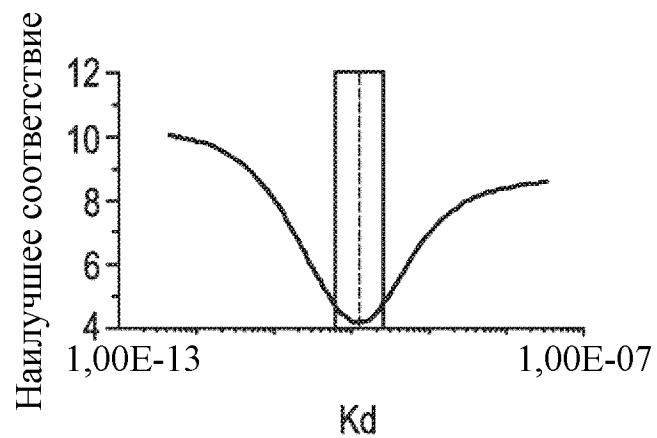


12/32

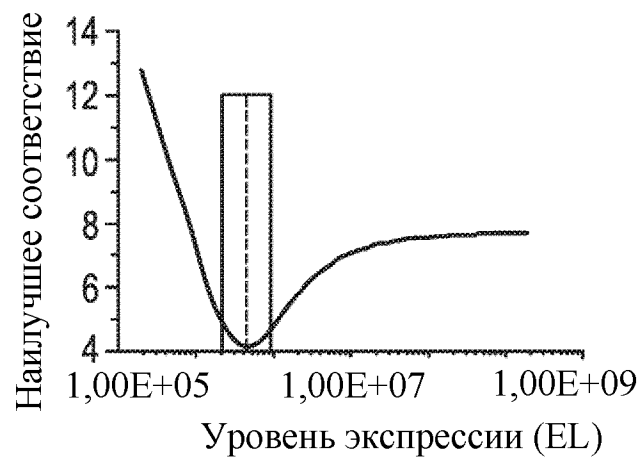
ФИГ. 7А



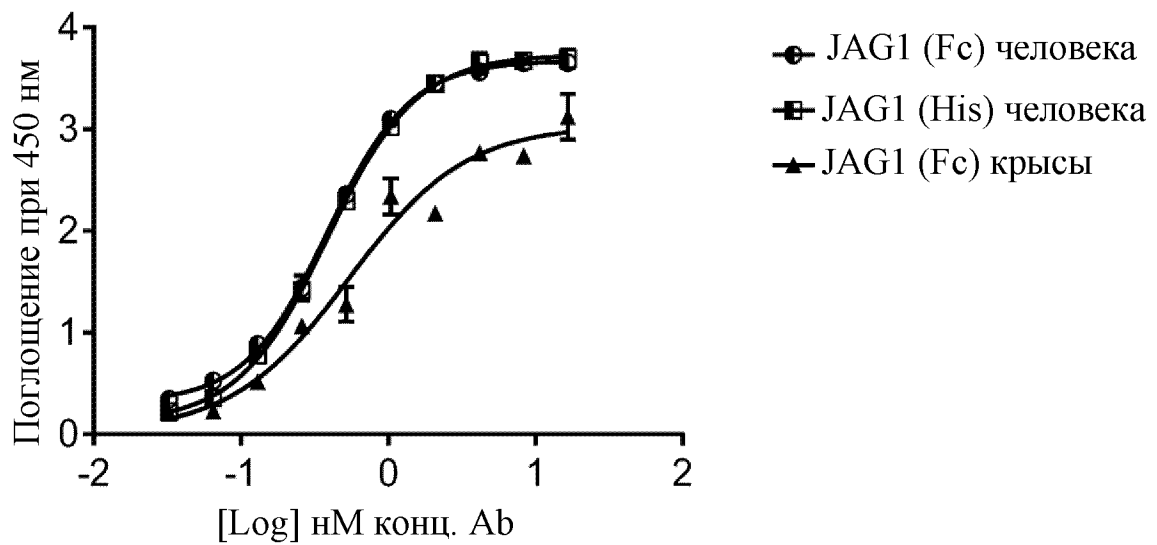
ФИГ. 7В



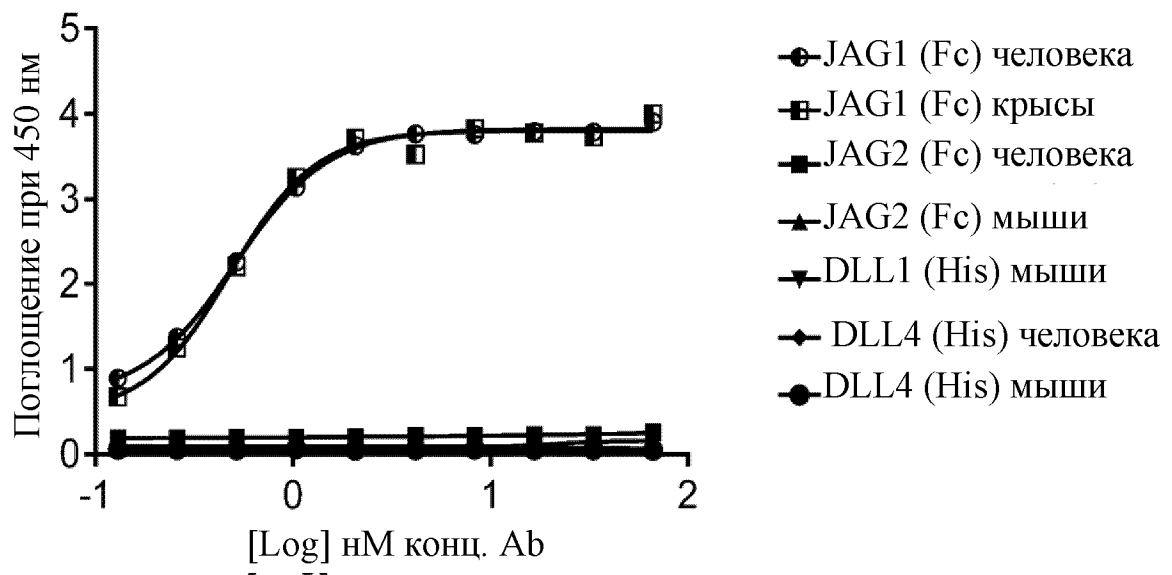
ФИГ. 7С



ФИГ. 8А

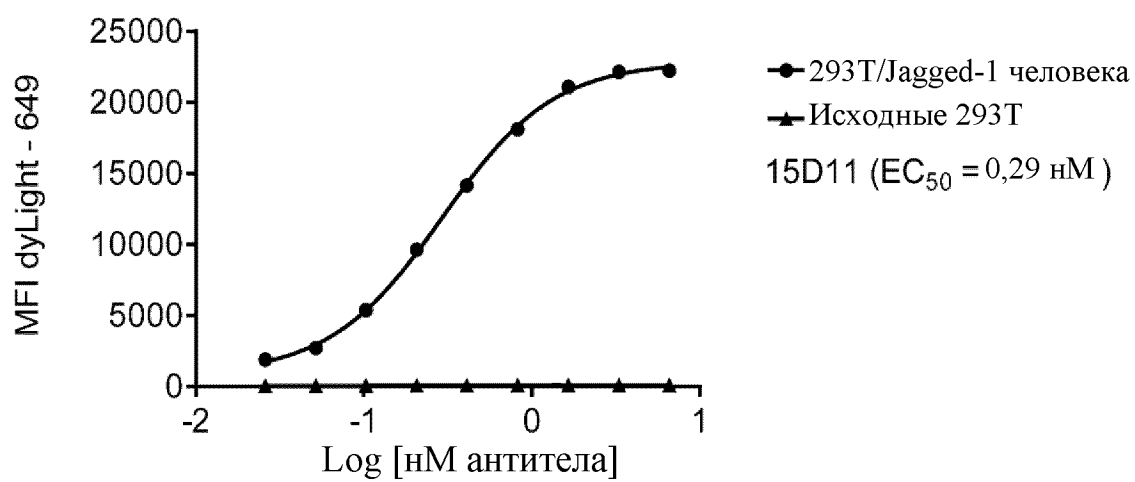


ФИГ. 8В

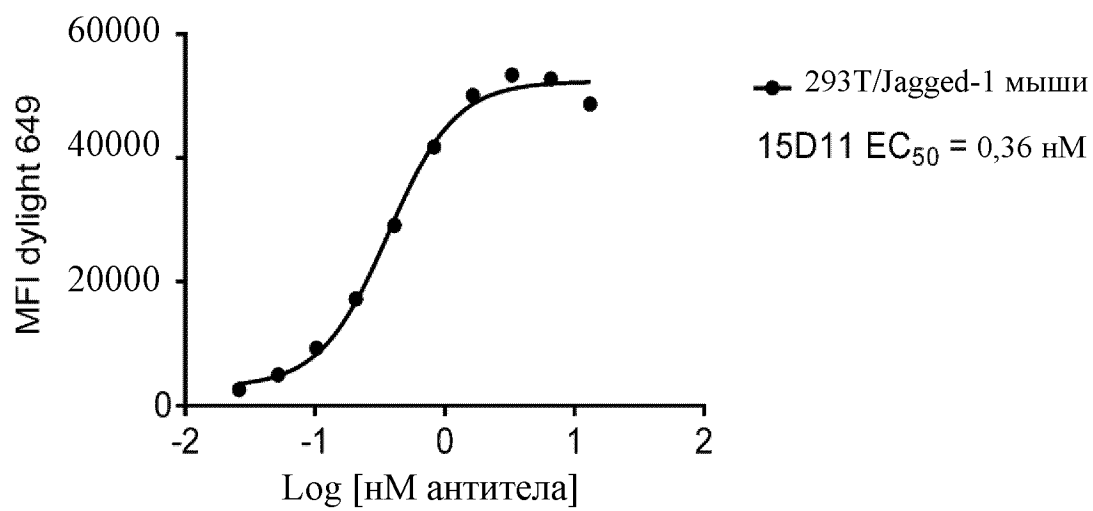


14/32

ФИГ. 9

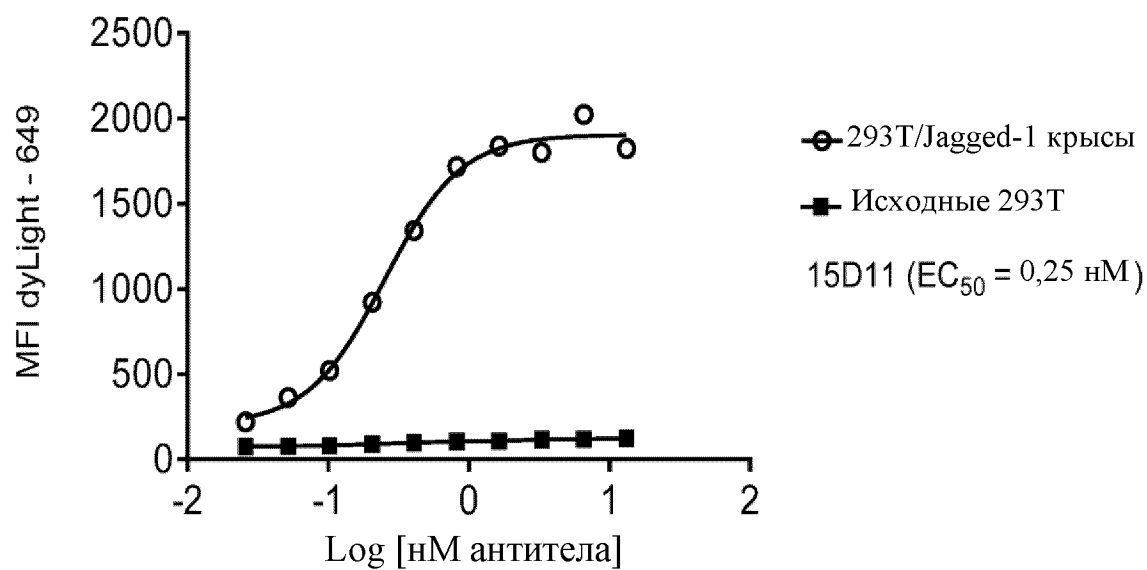


ФИГ. 10

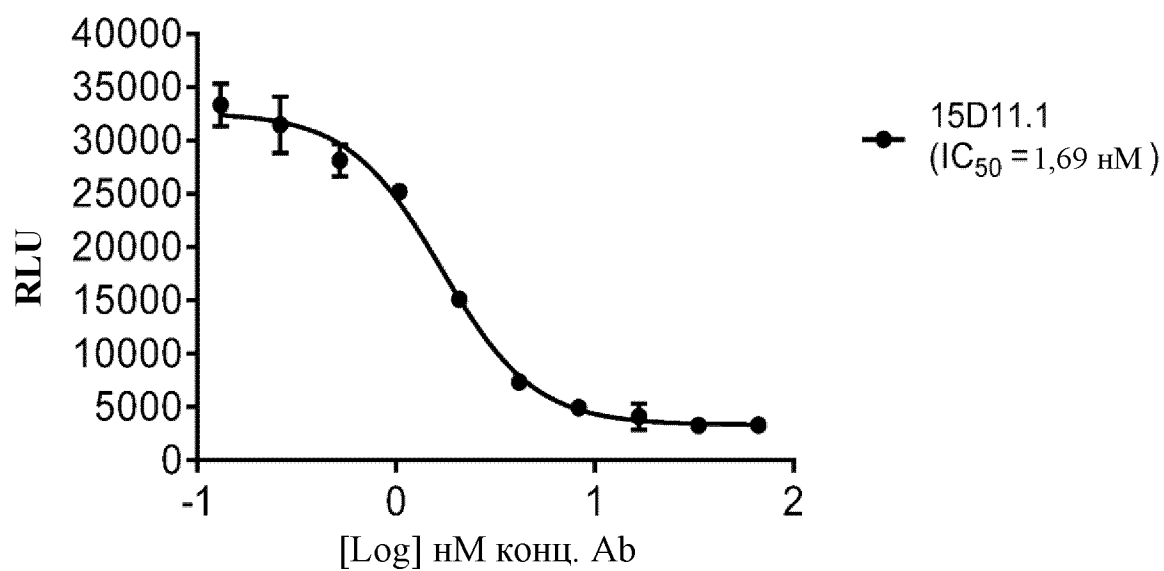


15/32

ФИГ. 11

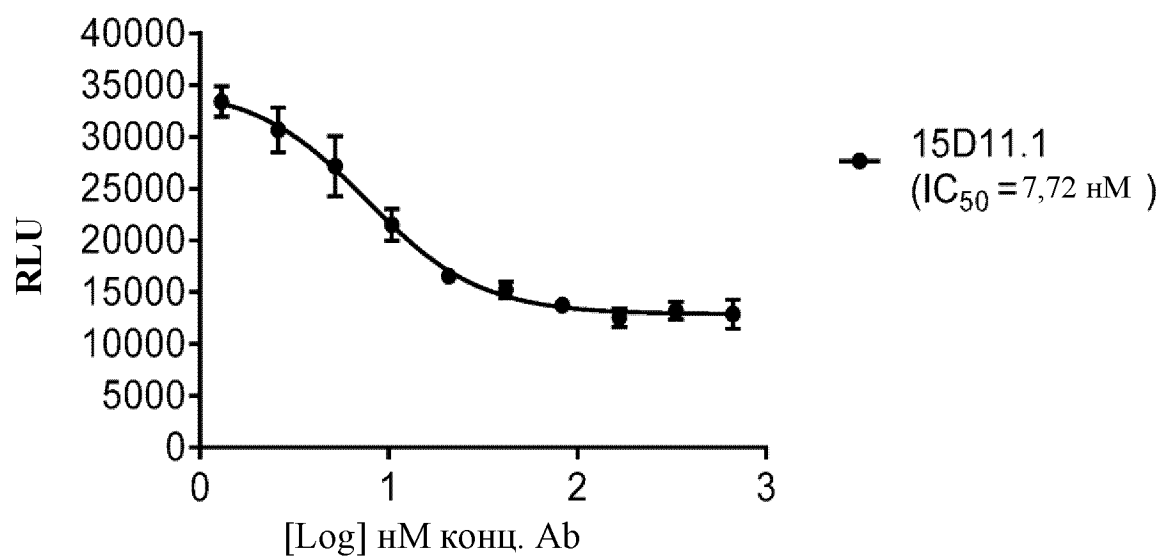


ФИГ. 12



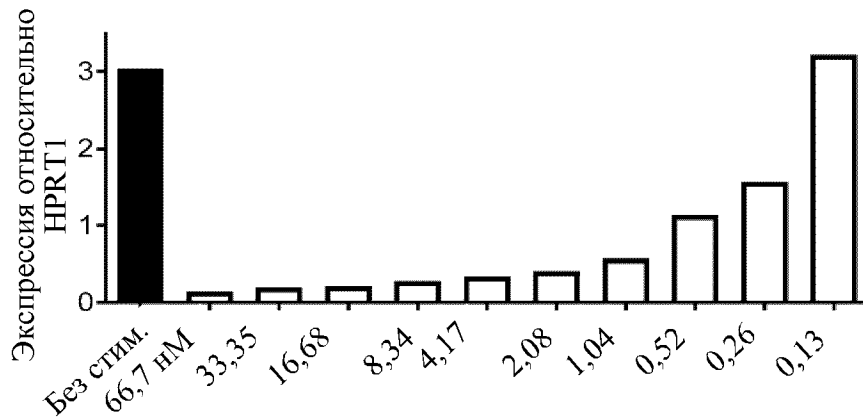
16/32

ФИГ. 13

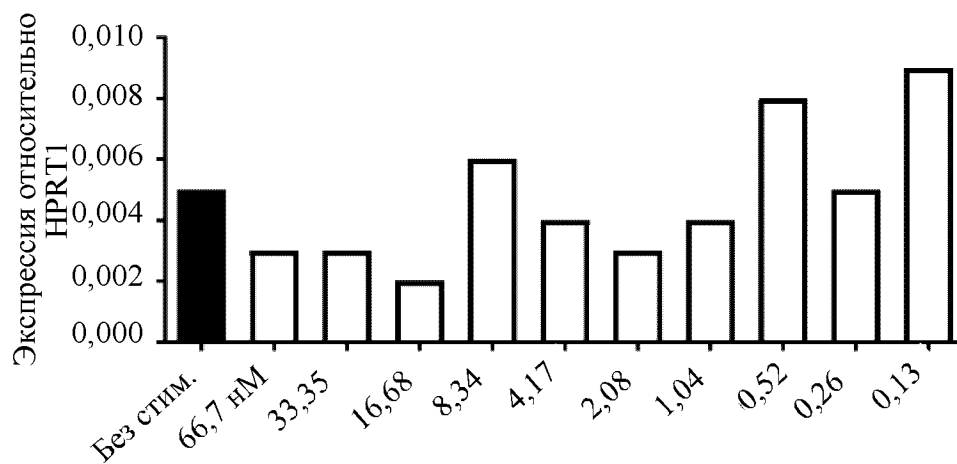


ФИГ. 14А

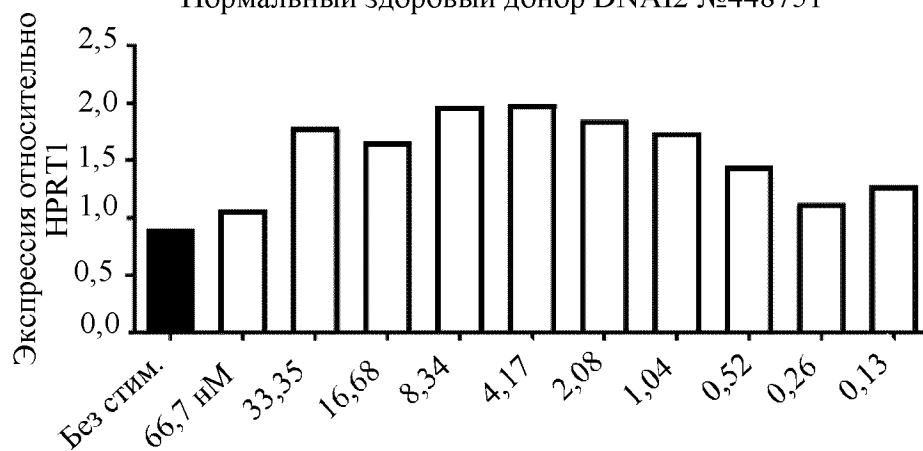
Нормальный здоровый донор SCGB1A1 №448751

**ФИГ. 14В**

Нормальный здоровый донор MUC5AC №448751

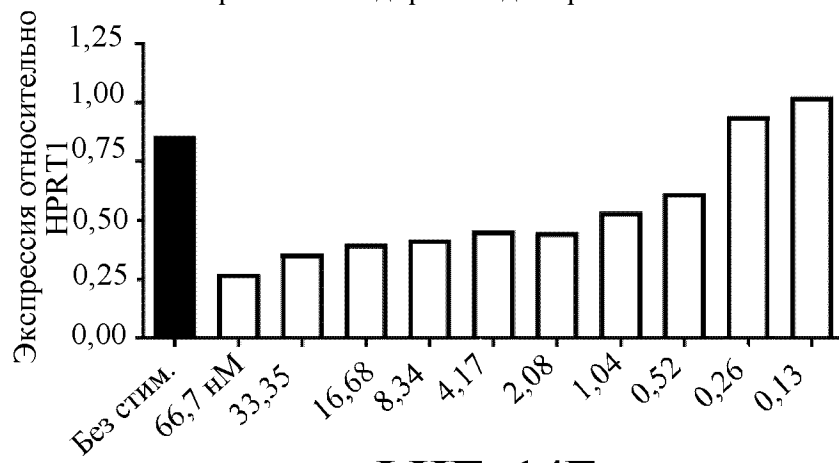
**ФИГ. 14С**

Нормальный здоровый донор DNAI2 №448751

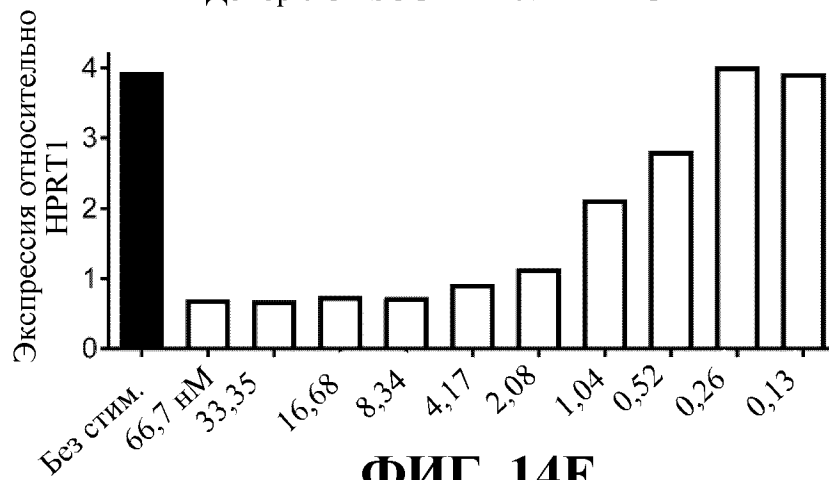


ФИГ. 14D

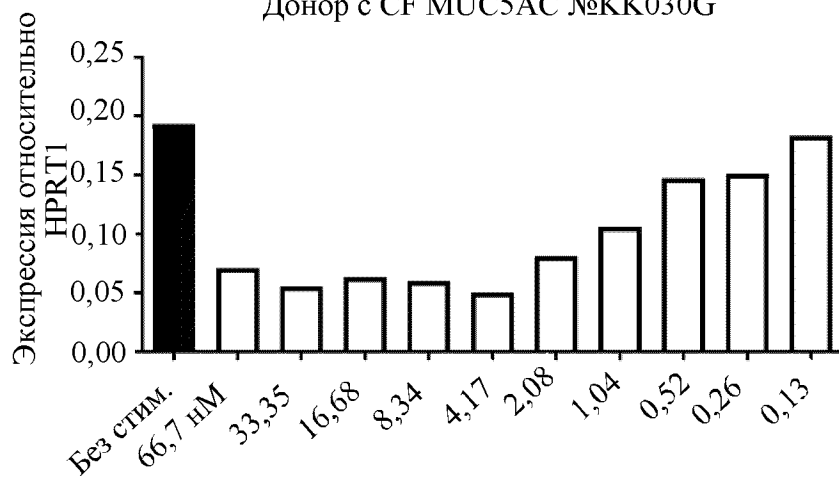
Нормальный здоровый донор NRARP №448751

**ФИГ. 14E**

Донор с CF SCGB1A1 №KK030G

**ФИГ. 14F**

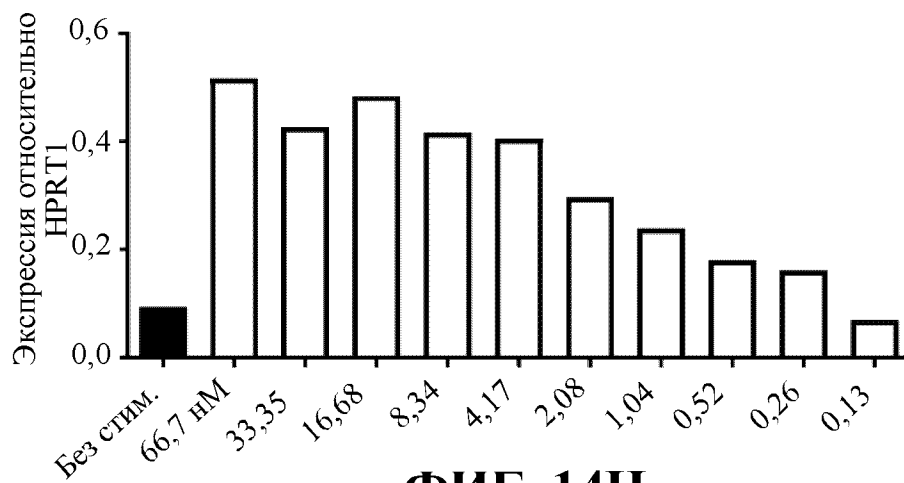
Донор с CF MUC5AC №KK030G



19/32

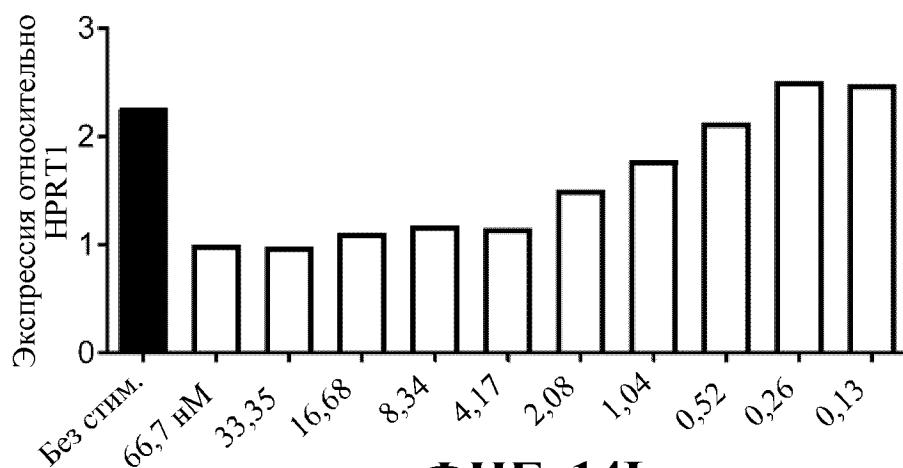
ФИГ. 14G

Донор с CF DNAI2 №KK030G



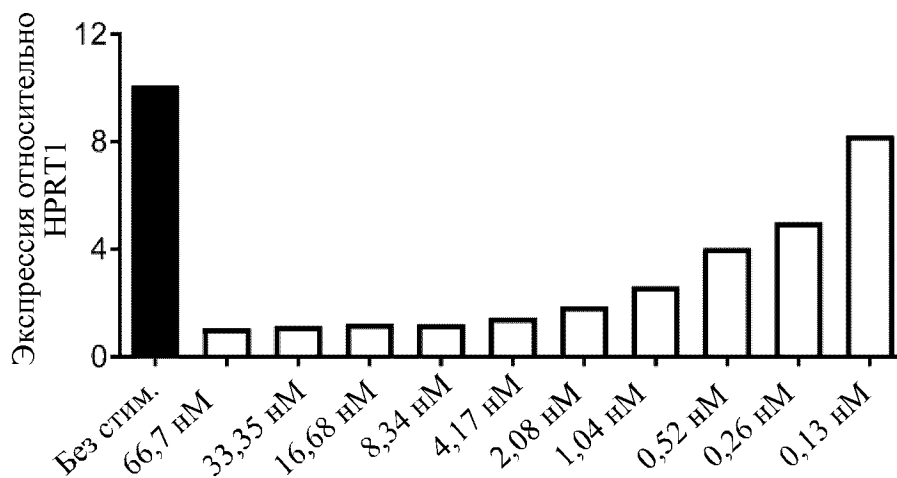
ФИГ. 14H

Донор с CF NRARP №KK030G



ФИГ. 14I

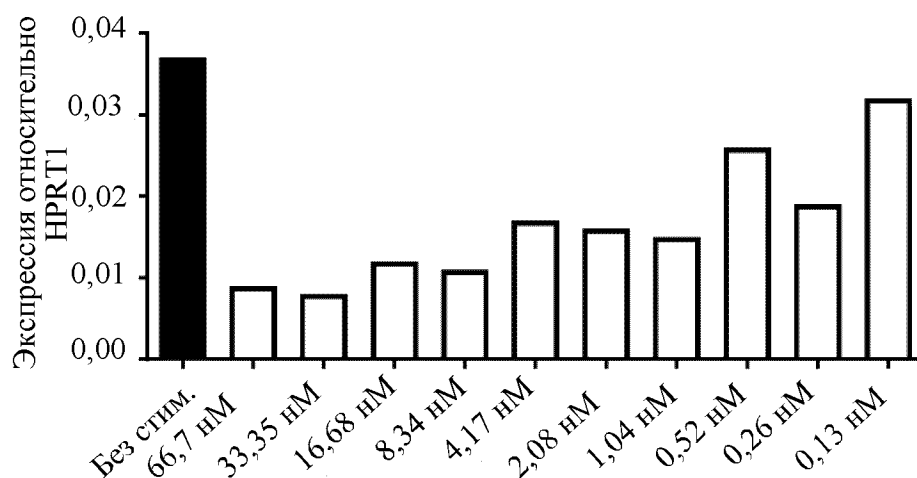
Донор с COPD SCGB1A1 №OF3207 7



20/32

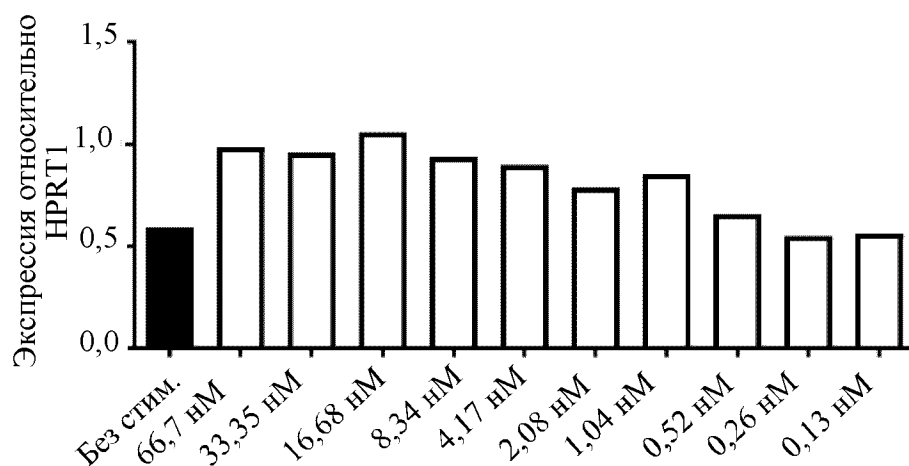
ФИГ. 14J

Донор с COPD MUC5AC №OF3207



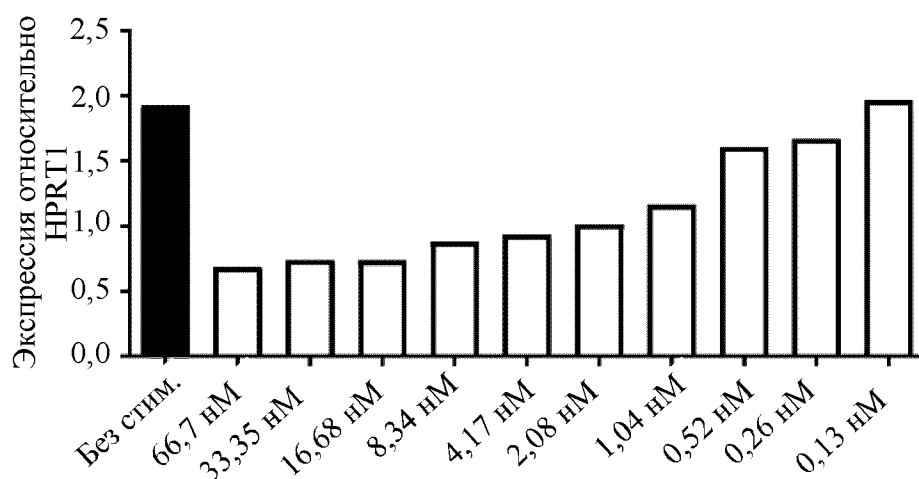
ФИГ. 14K

Донор с COPD DNAI2 №OF3207



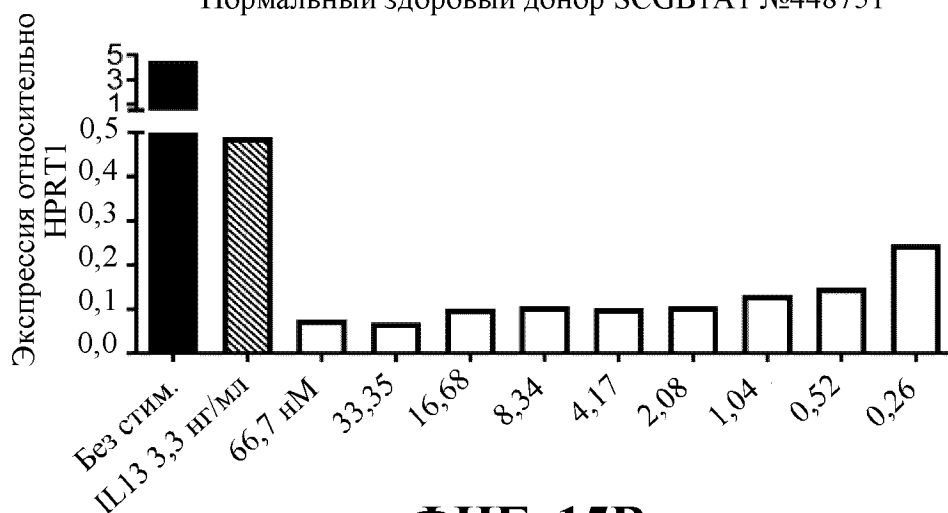
ФИГ. 14L

Донор с COPD NRARP №OF3207

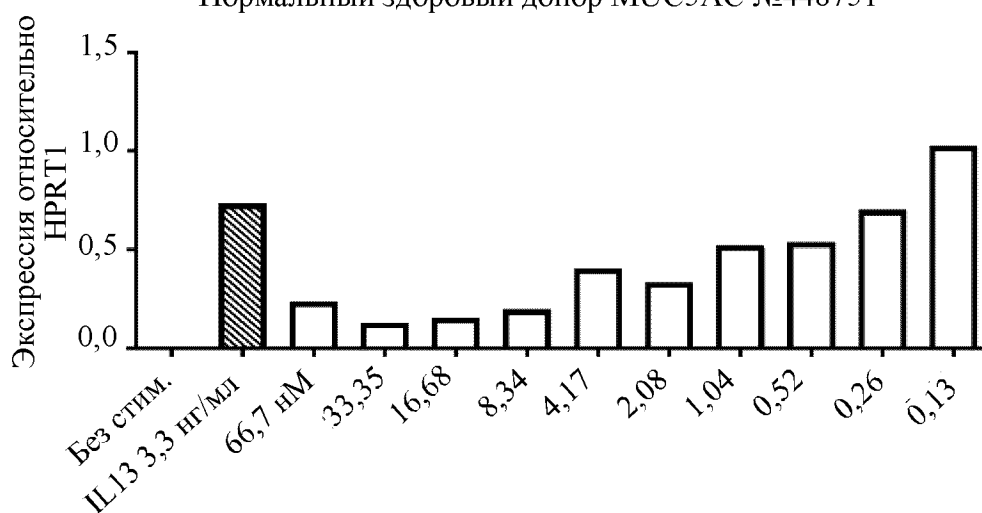


ФИГ. 15А

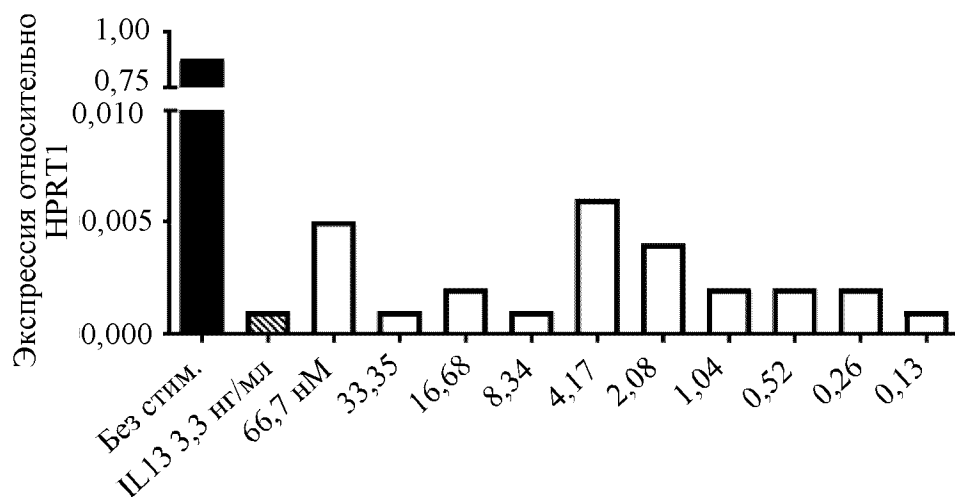
Нормальный здоровый донор SCGB1A1 №448751

**ФИГ. 15В**

Нормальный здоровый донор MUC5AC №448751

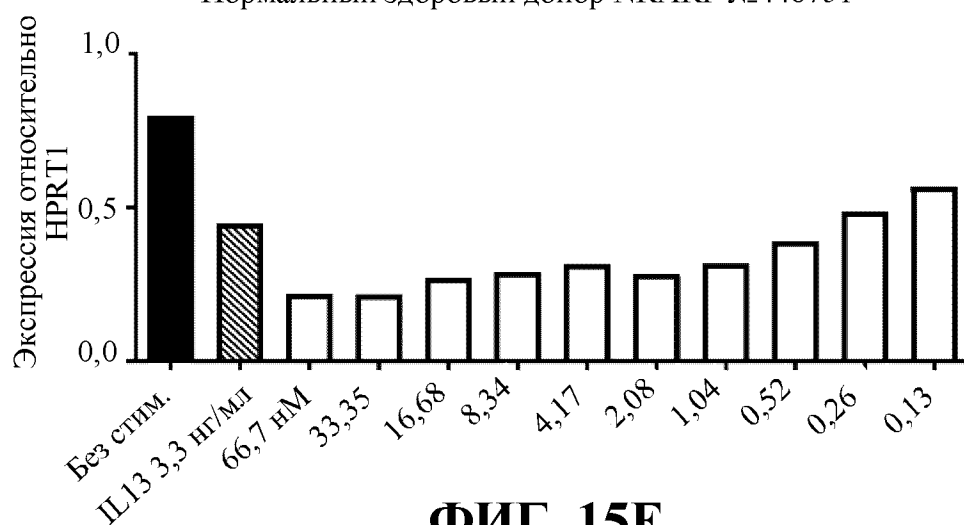
**ФИГ. 15С**

Нормальный здоровый донор DNAI2 №448751

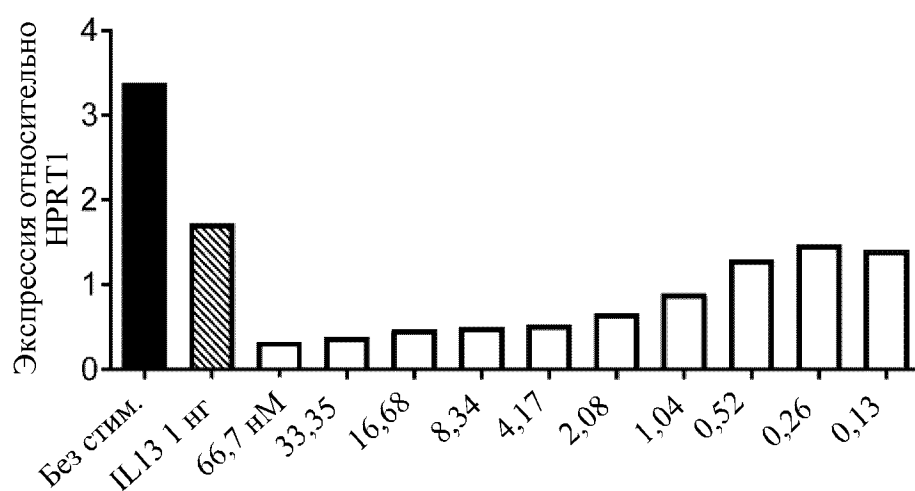


ФИГ. 15D

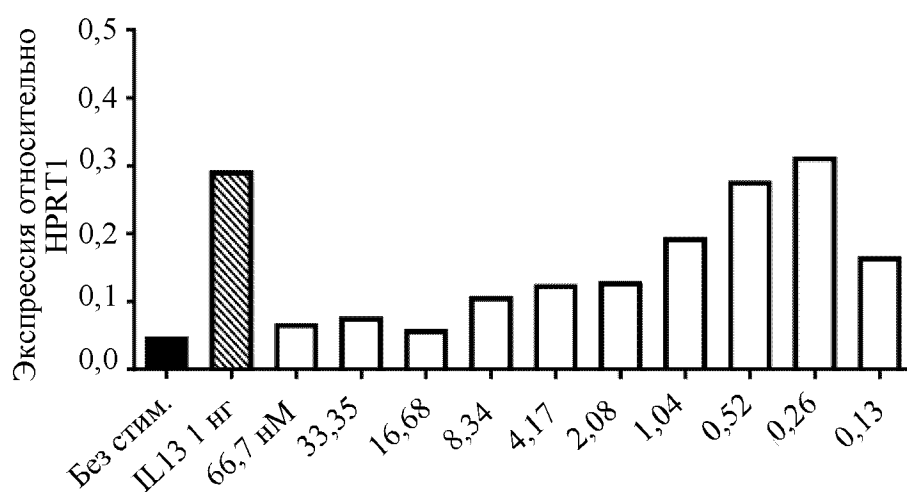
Нормальный здоровый донор NRARP №448751

**ФИГ. 15E**

Донор с CF SCGB1A1 №KK030G

**ФИГ. 15F**

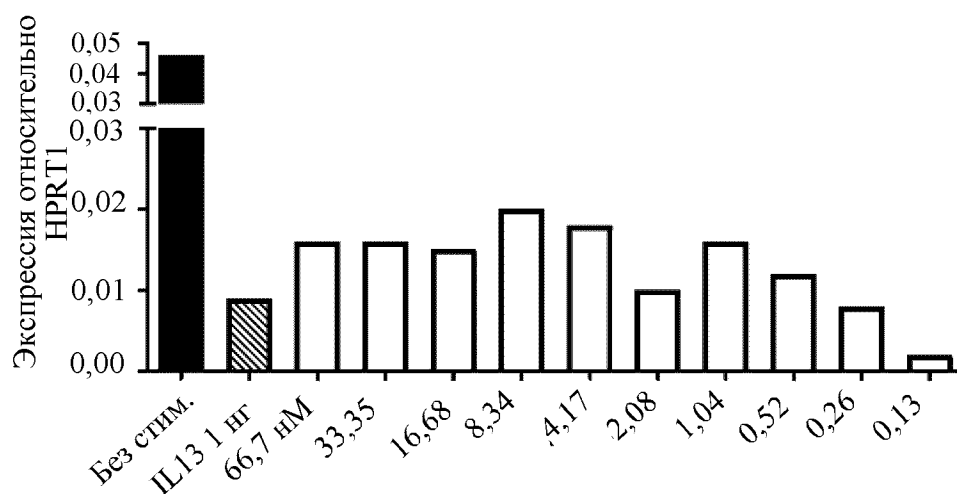
Донор с CF MUC5AC №KK030G



23/32

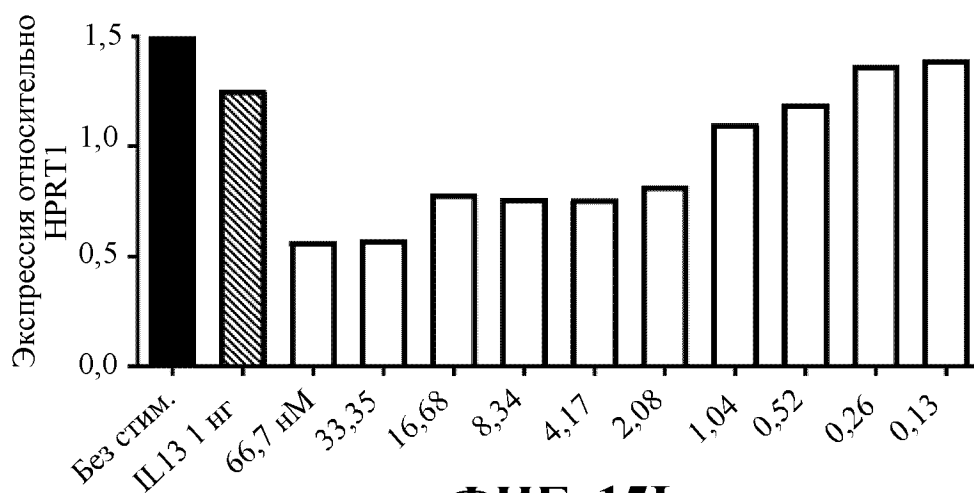
ФИГ. 15G

Донор с CF DNAI2 №KK030G



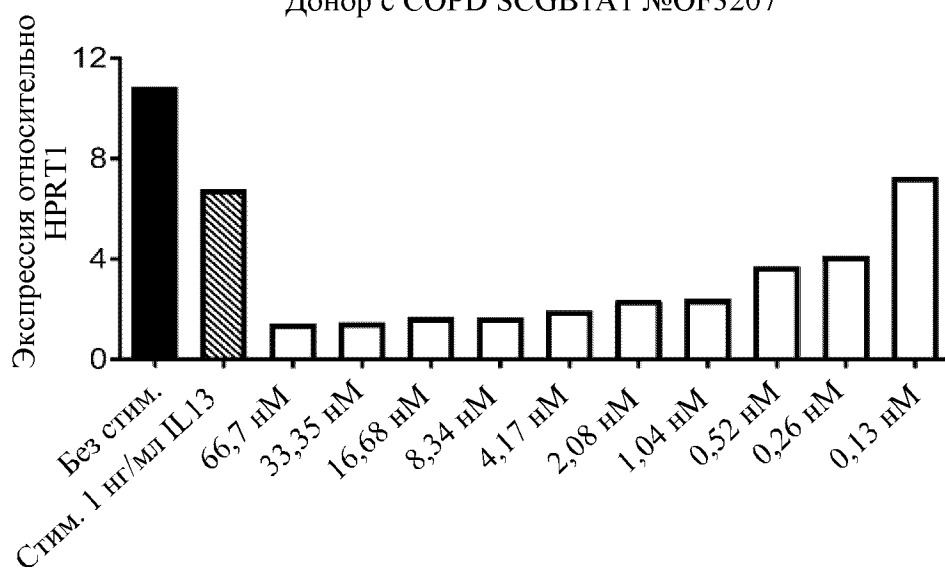
ФИГ. 15H

Донор с CF NRARP №KK030G



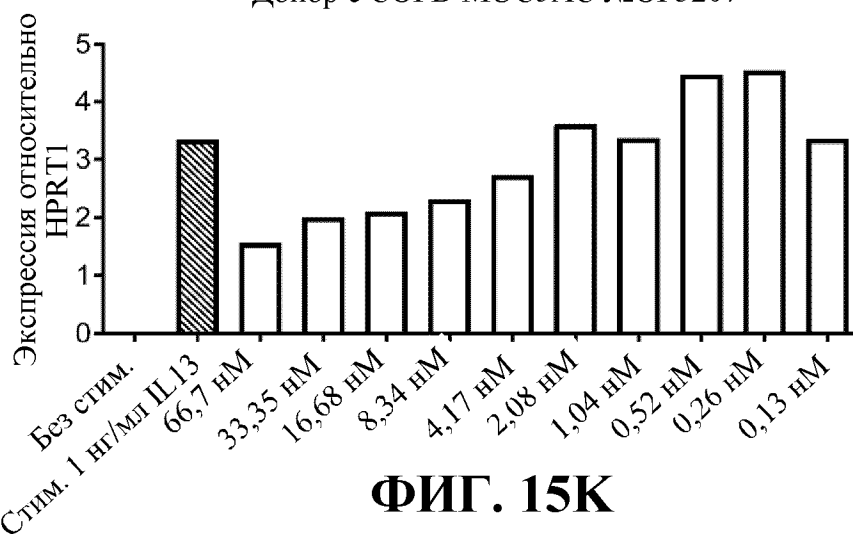
ФИГ. 15I

Донор с COPD SCGB1A1 №OF3207

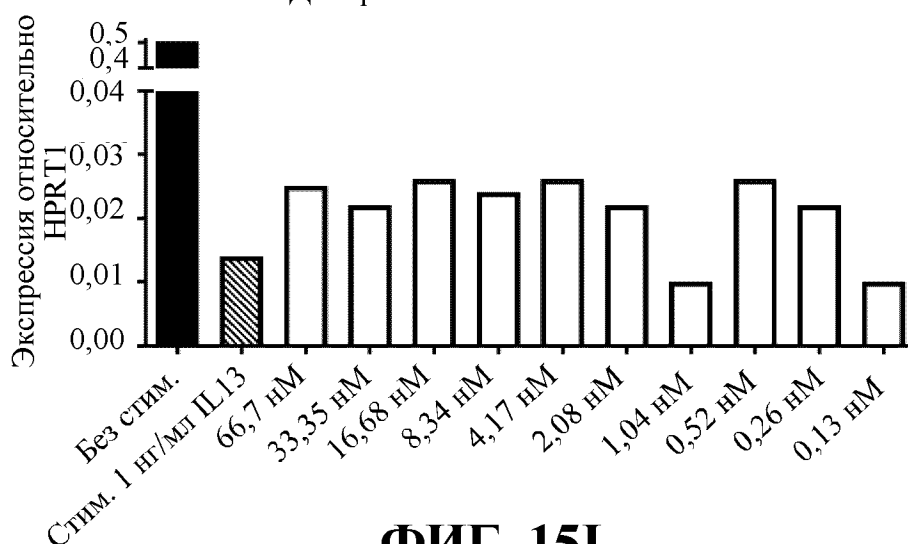


ФИГ. 15J

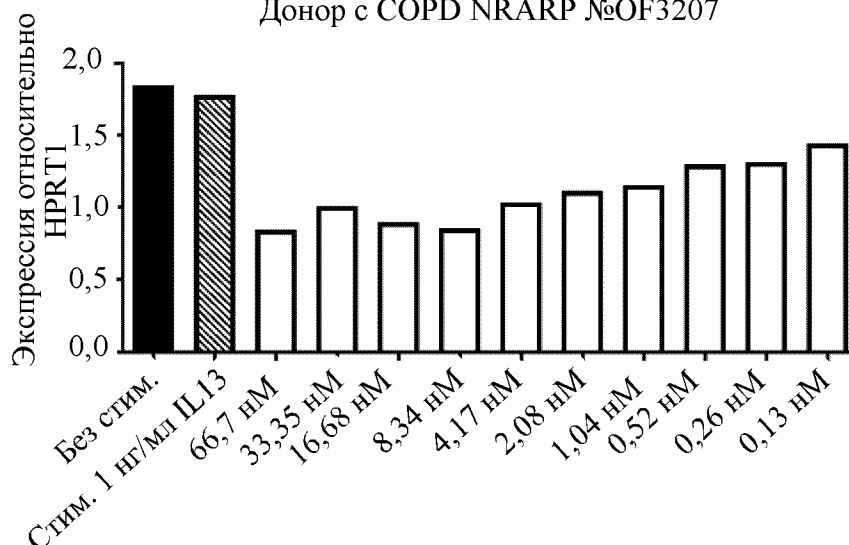
Донор с COPD MUC5AC №OF3207

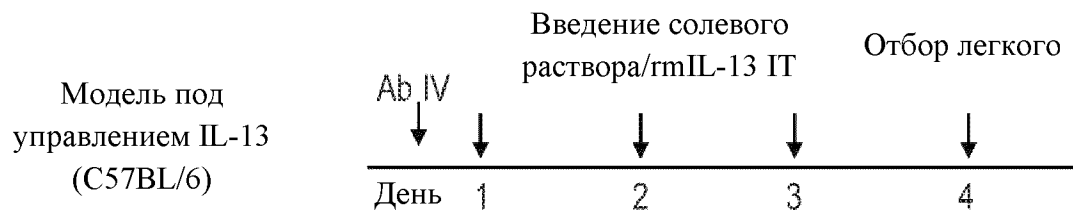
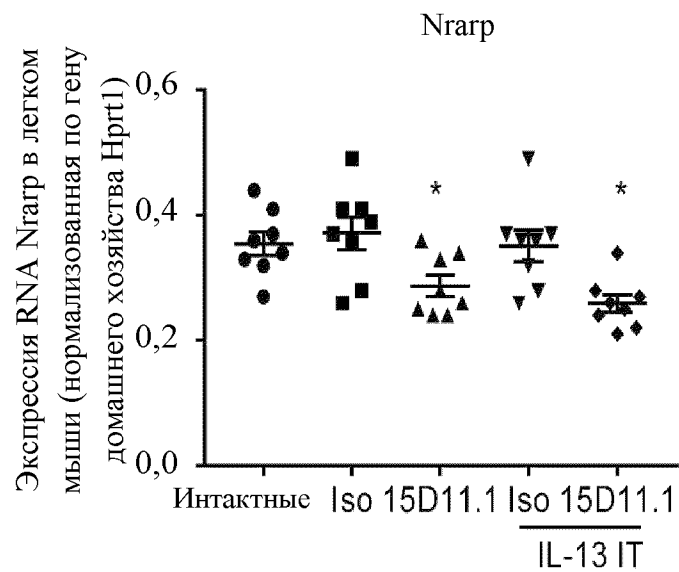
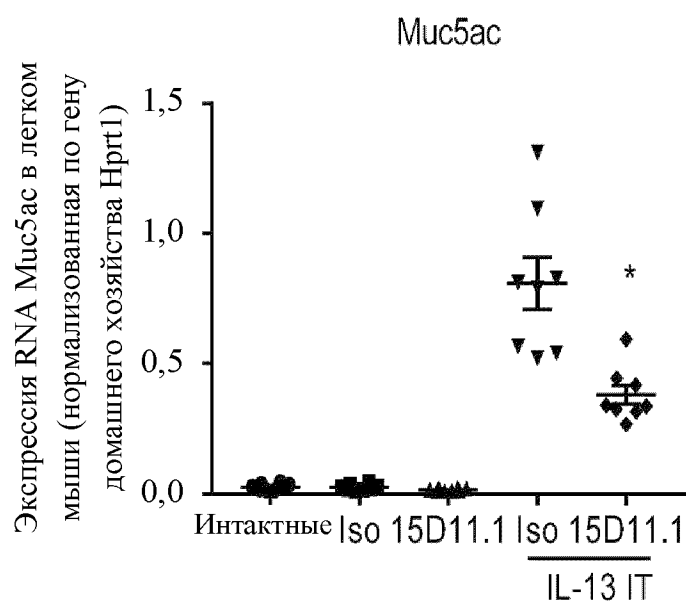
**ФИГ. 15K**

Донор с COPD DNAI2 №OF3207

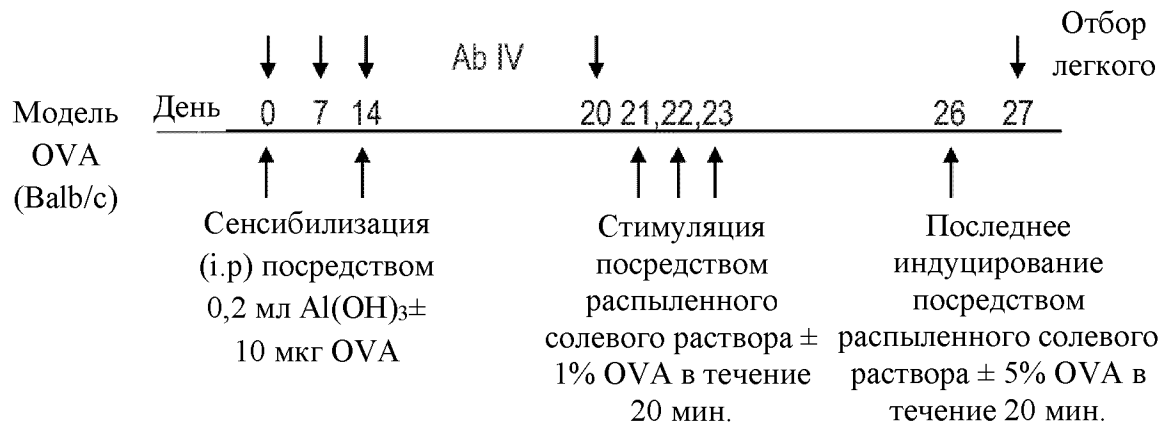
**ФИГ. 15L**

Донор с COPD NRARP №OF3207



ФИГ. 16А**ФИГ. 16В****ФИГ. 16С**

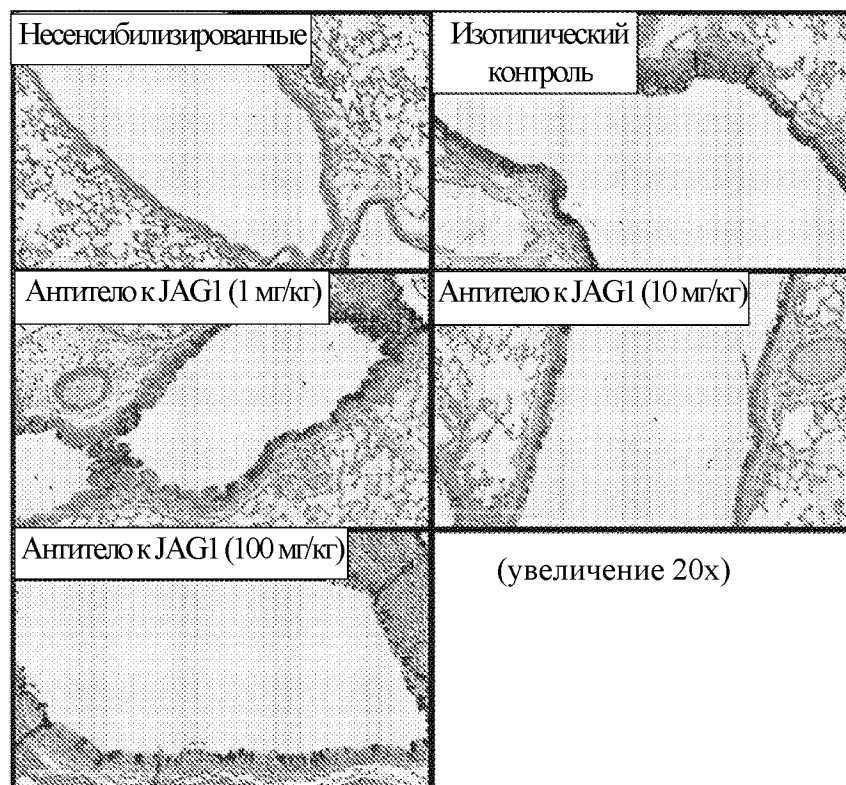
ФИГ. 17А



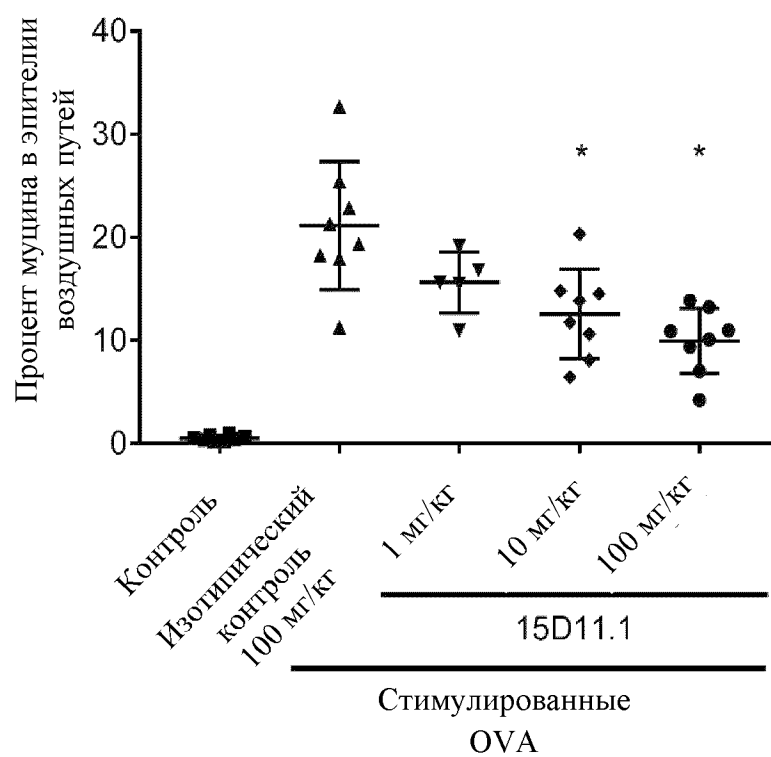
ФИГ. 17В



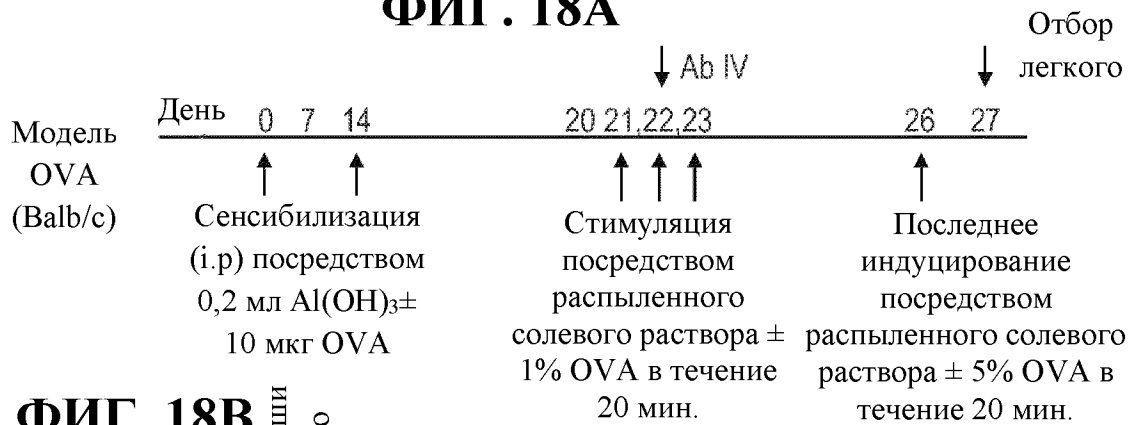
ФИГ. 17С



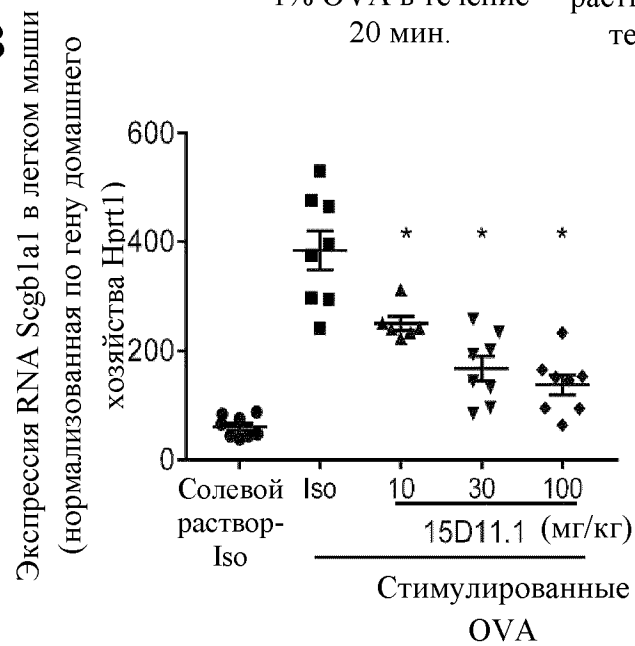
ФИГ. 17D



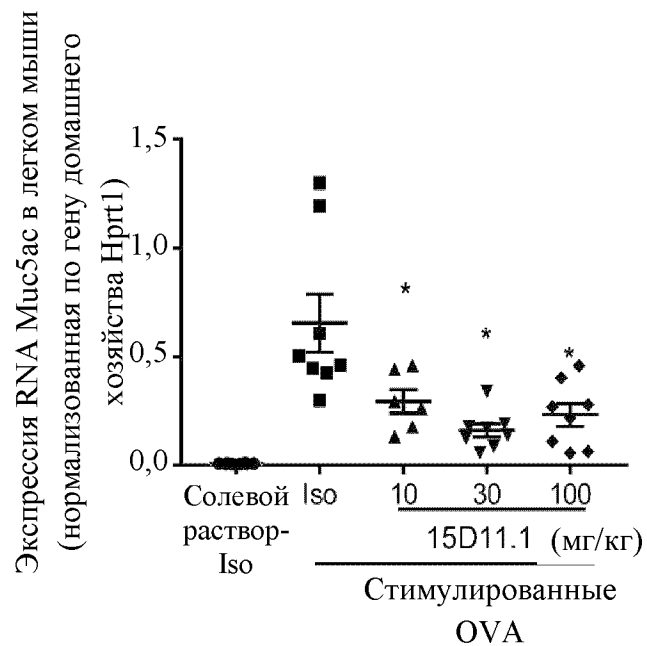
ФИГ. 18А



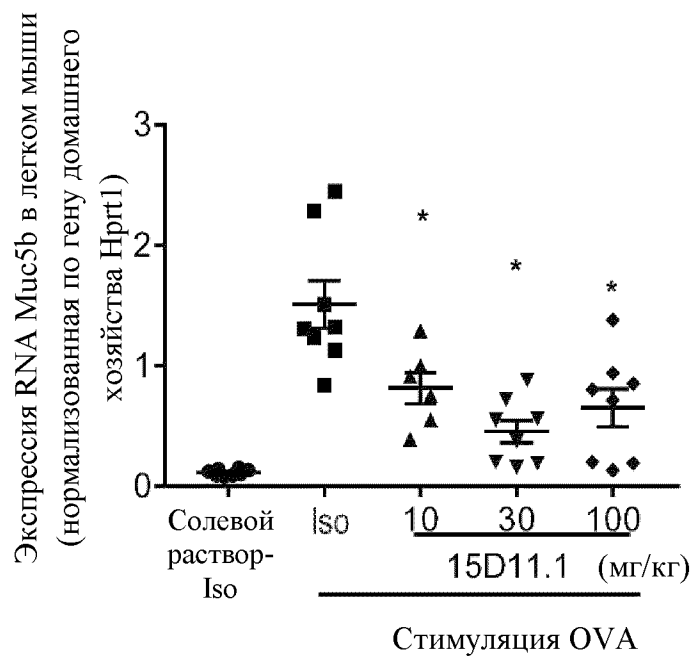
ФИГ. 18В



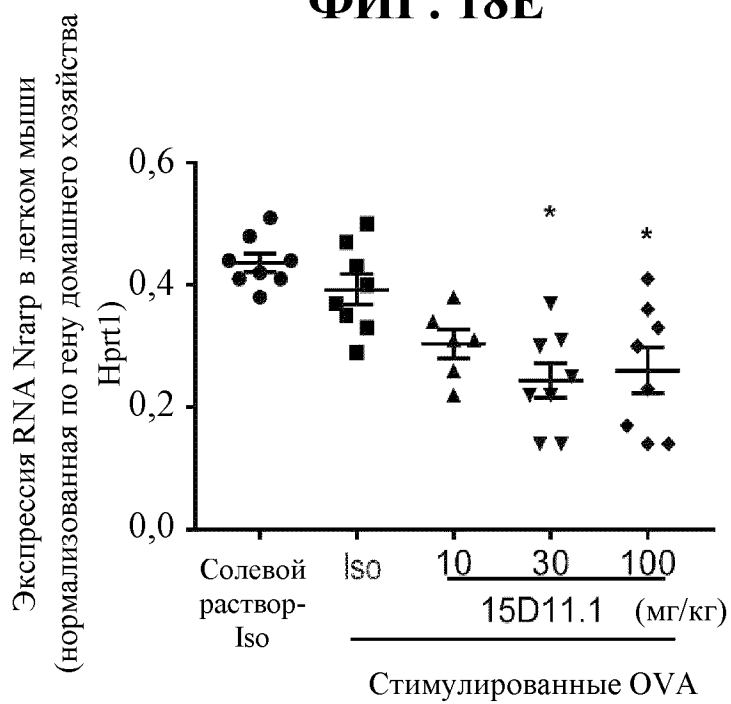
ФИГ. 18С



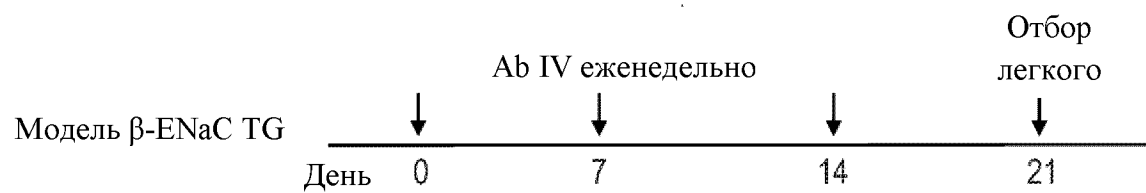
ФИГ. 18D



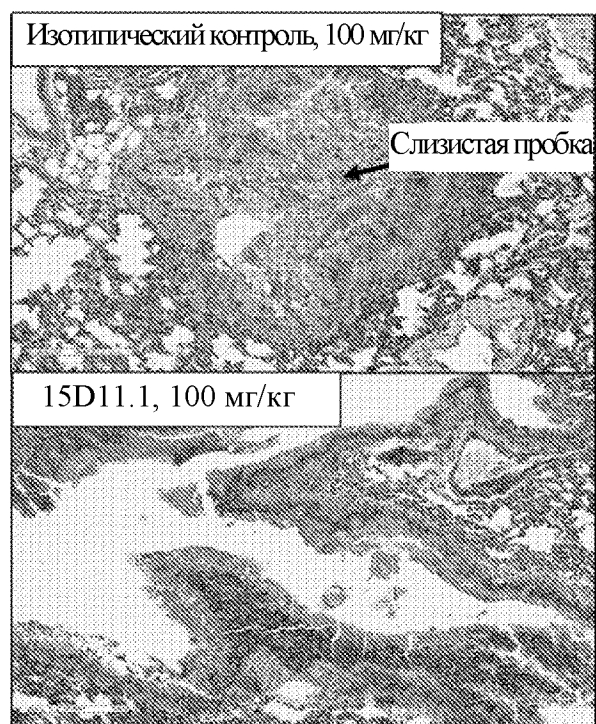
ФИГ. 18E



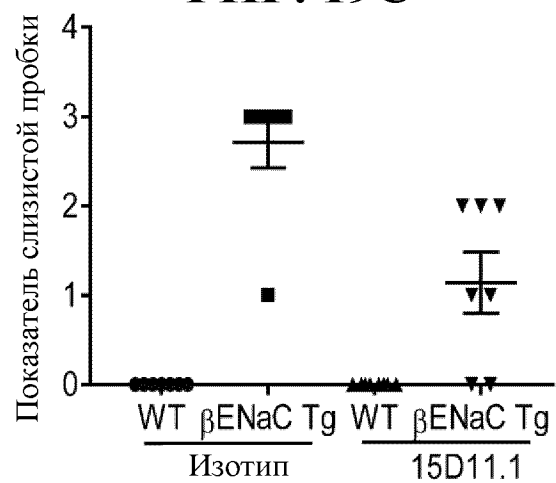
ФИГ. 19А



ФИГ. 19В

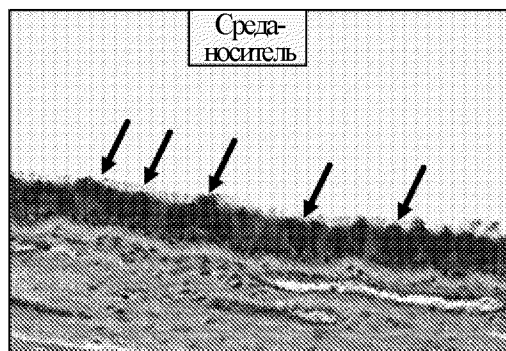


ФИГ. 19С



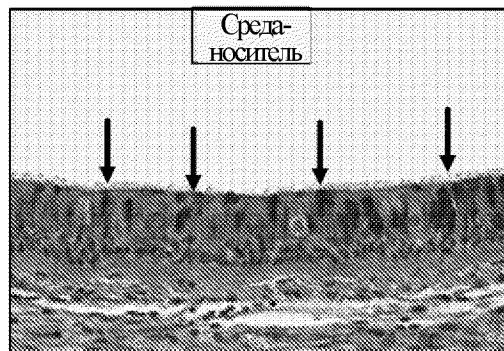
ФИГ. 20А

Носоглотка



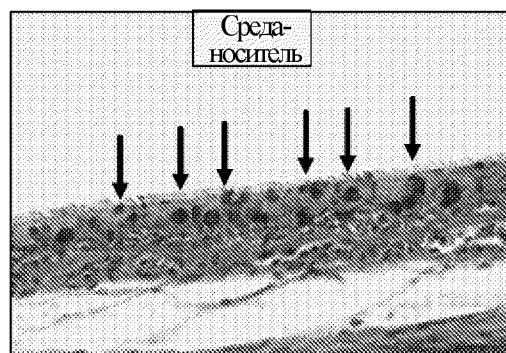
ФИГ. 20В

Трахея



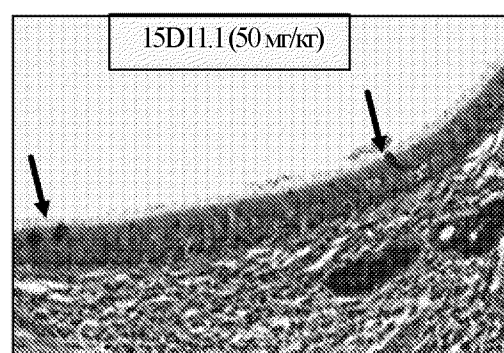
ФИГ. 20С

Бронхи



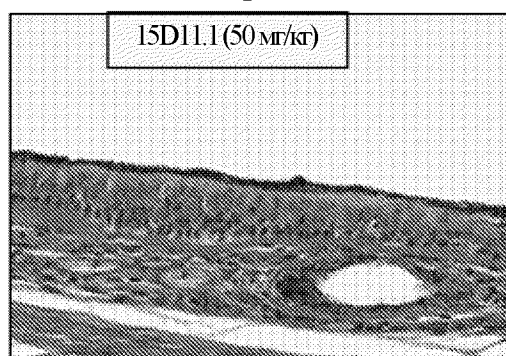
ФИГ. 20D

Носоглотка



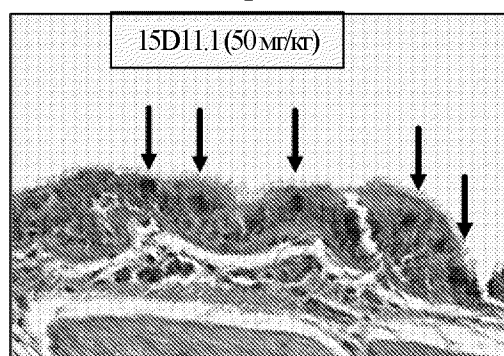
ФИГ. 20Е

Трахея

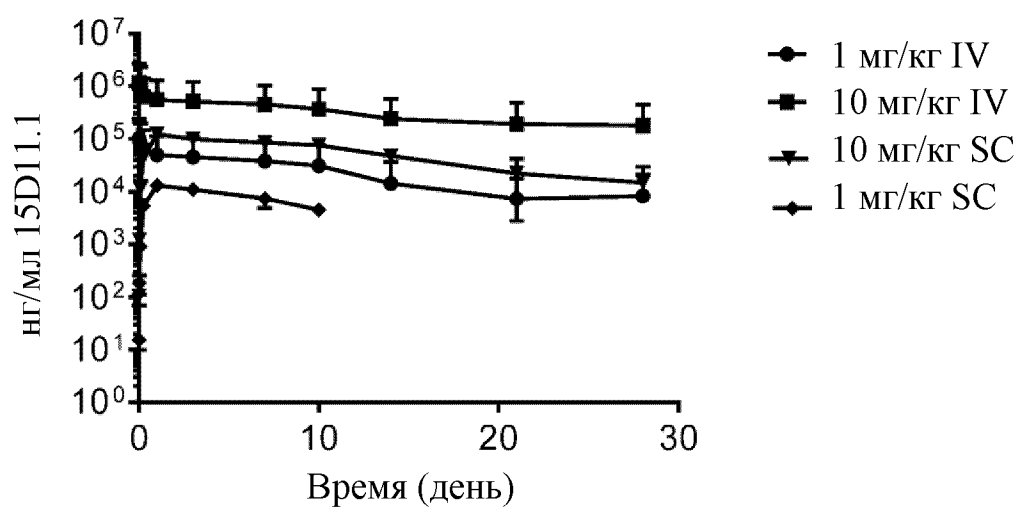


ФИГ. 20F

Бронхи



ФИГ. 21А



ФИГ. 21В

