

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090286 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.12

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.13

(54) АНТИТЕЛА К MAdCAM

(31) 62/532,809

(32) 2017.07.14

(33) US

(86) PCT/US2018/042052

(87) WO 2019/014572 2019.01.17

(71) Заявитель:

ПФАЙЗЕР, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Андерсон Карин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, включающим антитела человека и их антигенсвязывающие части, которые специфически связываются с MAdCAM, предпочтительно MAdCAM человека, и которые функционируют, ингибируя MAdCAM. Также изобретение относится к антителам человека против MAdCAM и их антигенсвязывающим частям. Также изобретение относится к антителам, которые представляют собой химерные, биспецифические, дериватизированные, одноцепочечные антитела или части слитых белков. Также изобретение относится к выделенным иммуноглобулинам тяжелой и легкой цепи, происходящим из антител человека против MAdCAM, и к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим такие иммуноглобулины. Также настоящее изобретение относится к способам получения антител человека против MAdCAM, композициям, содержащим эти антитела, и к способам применения антител и композиций для диагностики и лечения. Также изобретение относится к способам генной терапии с использованием молекул нуклеиновых кислот, кодирующих молекулы тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулинов, которые содержат антитела человека против MAdCAM. Также изобретение относится к трансгенным животным или растениям, содержащим молекулы нуклеиновых кислот по изобретению.

1A

CDR1 CDR2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAMSIVRQAPGKGLVWVGRISKETDGGTDDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ
Тяжелая цепь 1.7.2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSAISGFTFTNMMIIVRQAPGKGLVWVGRISKETDGGTDDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ
Тяжелая цепь 1.8.2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSAISGFTFTNMMIIVRQAPGKGLVWVGRISKETDGGTDDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ
CDR3
Продукт VH3-15 QNNSLKTEDTAVYYCTT--VA-DYWGQGITLVTVSSA
Тяжелая цепь 1.7.2 QNNSLKTEDTAVYYCTTGGVAEDYWGQGITLVTVSSA
Тяжелая цепь 1.8.2 QNNSLKTEDTAVYYCTTGGVAEDYWGQGITLVTVSSA

1B

CDR1 CDR2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAMSIVRQAPGKGLVWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ
Тяжелая цепь 6.14.2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFTNMMIIVRQAPGKGLVWVSTTSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ
CDR3
Продукт VH-3-23 NSLRARDETAVYYCA--GYSYG----YWGQGITLVTVSSA
Тяжелая цепь 6.14.2 NSLRARDETAVYYCAAGYSYGTTPYTWGQGITLVTVSSA

1C

CDR1 CDR2
QVQLVDSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHIVRQAPGKGLVWVAIVYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ
Тяжелая цепь 6.22.2
QVQLVDSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHIVRQAPGKGLVWVAIVYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ
CDR3
Продукт VH3-33 MNSLRARDETAVYYCAR--YTCMDVWQGGITVTVSSA
Тяжелая цепь 6.22.2 MNSLRARDETAVYYCARDPQYTCMDVWQGGITVTVSSA

1D

CDR1 CDR2
QVQLVDSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHIVRQAPGKGLVWVAIVYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ
Тяжелая цепь 6.34.2
QVQLVDSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHIVRQAPGKGLVWVAIVYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ
CDR3
Продукт VH3-30 MNSLRARDETAVYYCAR--TVVTVYTCMDVWQGGITVTVSSA
Тяжелая цепь 6.34.2 MNSLRARDETAVYYCARDSIAITVYTCMDVWQGGITVTVSSA

A1

202090286

202090286

A1

1E

	CDR1	CDR2
Продукт VH4-4		
QVQLQESGPGLVKPSBETLSLTCTVSGGSISSYHWNIRQPAKGLEWIGRIYTSGGSTYNFSLKSRVTMSVDTSKNQPSLKL		
Тяжелая цепь 6.67.1		
QVQLQESGPGLVKPSBETLSLTCTVSGGSISSYHWNIRQPAKGLEWIGRIYTSGGSTYNFSLKSRVTILADTSKNQPSLKL		
	CDR3	
Продукт VH4-4	SSVTAADTAVVYCAR--ITMVRGVI---FDYWGQGTLLTVSSA	
Тяжелая цепь 6.67.1	SSVTAADTAVVYCAR DRITIIISGLIPSPFDYWGQGTLLTVSSA	

1F

	CDR1	CDR2
Продукт VH3-23		
EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSYANMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ		
Тяжелая цепь 6.73.2		
EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSYANMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ		
	CDR3	
Продукт VH3-23	MNSLRADTAVVYCA--IAVA---TYFYMGMVWQGTLLTVSSA	
Тяжелая цепь 6.73.2	MNSLRADTAVVYCA IAVAGBLVYYGMVWQGTLLTVSSA	

1G

	CDR1	CDR2
Продукт VH3-21		
EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN		
Тяжелая цепь 6.77.1		
EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN		
	CDR3	
Продукт VH3-21	SLRAEDTAVVYCAR--GYSGGM---FYTYGMGVWQGTLLTVSSA	
Тяжелая цепь 6.77.1	SLRAEDTAVVYCAR BDYSSGWSFYTYGMGVWQGTLLTVSSA	

1H

	CDR1	CDR2
Продукт VH1-18		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYGIWNVRQAPQGLENWGMISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYME		
Тяжелая цепь 7.16.6		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYGIWNVRQAPQGLENWGMISVYSGNTNYAQVQGRVTMTDTSTSTAYMD		
Тяжелая цепь 7.26.4		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYGIWNVRQAPQGLENWGMISVYSGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYME		
	CDR3	
Продукт VH1-18	LRLSRDDTAVVYCAR--SSSS---YYYGMGVWQGTLLTVSSA	
Тяжелая цепь 7.16.6	LRLSRDDTAVVYCAR BGSSSSGDTFYGMGVWQGTLLTVSSA	
Тяжелая цепь 7.26.4	LRLSRDDTAVVYCAR BGSSSSGDTFYGMGVWQGTLLTVSSA	

1I

	CDR1	CDR2
Продукт VH4-4		
QVQLQESGPGLVKPSBETLSLTCTVSGGSISSYHWNIRQPAKGLEWIGRIYTSGGSTYNFSLKSRVTMSVDTSKNQPSLKLAS		
Тяжелая цепь 7.20.5		
QVQLQESGPGLVKPSBETLSLTCTVSGGSISSYHWNIRQPAKGLEWIGRIYTSGGSTYNFSLKSRVTMSLDTSKNQPSLKLGS		
	CDR3	
Продукт VH4-4	VTAAATAVVYCAR----YYYSGGS---YTGMDVWQGTLLTVSSA	
Тяжелая цепь 7.20.5	VTAAATAVVYCAR EGDVRVYASGSYTYGLDVWQGTLLTVSSA	

1J

	CDR1	CDR2
Продукт VH3-33		
QVQLVESGGGVDPQRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWAVIYDGSNNKYADSVKGRFTISRDN		
Тяжелая цепь 9.8.2		
QVQLVESGGGVDPQRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWAVIYDGSNNKYADSVKGRFTISRDN		
	CDR3	
Продукт VH3-33	SKNTLYLQMNLSRAEDTAVVYCA----FDYWGQGTLLTVSSA	
Тяжелая цепь 9.8.2	SKNTLYLQMNLSRAEDTAVVYCA RGATHFAYWGQGTLLTVSSA	

1K

	CDR1	CDR2
Продукт A3		
Цепь kappa 1.7.2	DIVMTQSPQLSLPVTGPFPASISCSBSQSLLQSNQNTYLDWYLQPKQSPQLLIYLGSNRASGVDPFRPSG	
Цепь kappa 1.8.2	DIVMTQSPQLSLPVTGPFPASISCSBSQSLLQSNQNTYLDWYLQPKQSPQLLIYLGSNRASGVDPFRPSG	
	CDR3	
Продукт A3	SGSGTDFTLKISRVEADVGVVYCMQALQITTFPGQGTLEIKR	
Цепь kappa 1.7.2	SGSGTDFTLKISRVEADVGVVYCMQALQITTFPGQGTLEIKR	
Цепь kappa 1.8.2	SGSGTDFTLKISRVEADVGVVYCMQALQITTFPGQGTLEIKR	

1L

	CDR1	CDR2
Продукт O12		
Цепь kappa 6.14.2	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKVLIPASSLQSGVPSRPSGS	
	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKVLIPVSSLQSGVPSRPSGS	
	CDR3	
Продукт O12	GSQTDFTLTISSLQPEDFATVYCCQSYSTP--TFPGQGTLEIKR	
Цепь kappa 6.14.2	GSQTDFTLTISSLQPEDFATVYCCQNTPTPTTFPGQGTLEIKR	

1M

	CDR1	CDR2
Продукт A26		
Цепь kappa 6.22.2	EIVLTQSPDPQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQKPDQSFKLLIKYASQSPFGVPSRPSGS	
	EIVLTQSPDPQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQKPDQSFKLLIKYASQSPFGVPSRPSGS	
	CDR3	
Продукт A26	GSQTDFTLTINSLAEADAATVYCHQSSSL--TFPGQGTKEIKR	
Цепь kappa 6.22.2	GSQTDFTLTINSLAEADAATVYCHQ SGRLPL TFPGQGTKEIKR	

1N

	CDR1	CDR2
Продукт O12		
Цепь kappa 6.34.2	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRPSGS	
	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYA ASGLK SGVPSRPSGS	
	CDR3	
Продукт O12	GSQTDFTLTISSLQPEDFATVYCCQSYSTFTFFPGQGTKEIKR	
Цепь kappa 6.34.2	GSQTDFTLTITKLQPDGFATYCHQSYSLFFTFPGQGTKEIKR	

1O

	CDR1	CDR2
Продукт B3		
Цепь kappa 6.67.1	DIVMTQSPDSLAVALGERATINCKSSQSVLYSSNNWYLANWYQKPPKLLIYNASTRESGVDPDRPSGS	
	DIVMTQSPDSLAVALGERATINCKSSQSVLYSSNNWYLANWYQKPPKLLIYNASIREYGVDPDRPSGS	
	CDR3	
Продукт B3	SGTDFTLTISSLQAEADVAVVYCCQYYSITP-LTFPGQGTKEIKR	
Цепь kappa 6.67.1	SGTDFTLTISSLQAEADVAVVYCCQYYS IFPL TFPGQGTKEIKR	

1P

	CDR1	CDR2
Продукт O12		
Цепь kappa 6.73.2	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRPSGS	
	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQNTWYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRPSGS	
	CDR3	
Продукт O12	GTDFLTLTISSLQPEDFATVYCCQSYSTP----FGQGTLLDIKR	
Цепь kappa 6.73.2	GTDFLTLTISSLQPEDFATVYCCQSY SNFPC FPQGTLLDIKR	

1Q

	CDR1	CDR2
Продукт A2		
Цепь kappa 6.77.1	DIVMTQTPLSLGVTPGPASISCSQSGLLHSDGKTYLWYQKQPPQLLIYEVSNRFSGVDPDRPSGS	
	DIVMTQTPLSLGVTPGPASISCSQSGLLHSDGKTYLWYQKQPPQLLIYEVSNRFSGVDPDRPSGS	
	CDR3	
Продукт A2	GSQTDFTLKISRVEADVGVVYCMQSLQL--TFPGQGTKEIKR	
Цепь kappa 6.77.1	GSQTDFTLKISRVEADVGVVYCMQSLQL MCSP QGTKEIKR	

1R

	CDR1	CDR2
Продукт A2		
Цепь kappa 7.16.6	DIVMTQTPLSLGVTPGPASISCSQSGLLHSDGKTYLWYQKQPPQLLIYEVSNRFSGVDPDRPSGS	
Цепь kappa 7.26.4	DIVMTQTPLSLGVTPGPASISCSQSGLLHSDGKTYLWYQKQPPQLLIYEVSNRFSGVDPDRPSGS	
	CDR3	
Продукт A2	GSQTDFTLKISRVEADVGVVYCMQSLQLFWTPQGTKEIKR	
Цепь kappa 7.16.6	GSQTDFTLKISRVEADVGVVYCMQ NIQLFW TPQGTKEIKR	
Цепь kappa 7.26.4	GSQTDFTLKISRVEADVGVVYCMQSLQLFWTPQGTKEIKR	

1S		
Продукт A3	DI VMTQSP LSLPVTTPGEPA SISC RSGQSLLHGNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSHRASGVDRPSG	CDR1CDR2
Цена катта 7.20.5	DI VMTQSP LSLPVTTPGEPA SISC RSGQSLLHGNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSHRASGVDRPSG	
		CDR3
Продукт A3	SGSGTDFTLKISRVEAEDG VYYCMQALQLTLPGGGTKVEIKR	
Цена катта 7.20.5	SGSGTDFTLKISRVEAEDG VYYCMQALQLTLPGGGTKVEIKR	
1T		
Продукт O18	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRPSGS	CDR1CDR2
Цена катта 9.8.2	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRPSGS	
		CDR3
Продукт O18	GSQTDFTFTISSIQPEDIA TYYCQYDNL-ITPGQOTRLEIKR	
Цена катта 9.8.2	GSQTDFTFTISSIQPEDIA TYYCQYDNL-ITPGQOTRLEIKR	

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 560921EA/045

АНТИТЕЛА К MAdCAM

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящей заявке испрашивается преимущество и приоритет по U.S.S.N. 62/532809, поданной 14 июля 2017 года, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ

[0002] Содержимое текстового файла под названием "SHR-1258A_ST25.txt", который был создан 14 июля 2017 года и имеет размер 197 кБ, включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОМУ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Молекула клеточной адгезии типа "адрессин" в слизистых оболочках 1 (MAdCAM) является представителем суперсемейства иммуноглобулинов, включающего рецепторы клеточной адгезии. Селективность хоминга лимфоцитов в специализированную лимфоидную ткань и области слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта определяется эндотелиальной экспрессией MAdCAM (Berlin, C. et al., Cell, 80:413- 422(1994); Berlin, C., et al., Cell, 74:185-195 (1993); и Erle, D.J., et al., J. Immunol., 153: 517-528 (1994)). MAdCAM экспрессируется исключительно на клеточной поверхности венул с высоким эндотелием организованной лимфоидной ткани кишечника, такой как пейеровы бляшки и мезентериальные лимфоузлы (Streeter et al., Nature, 331:41-6 (1988); Nakache et al., Nature, 337:179-81 (1989); Briskin et al., Am. J. Pathol. 151:97-110 (1997)), но также и в других лимфоидных органах, таких как поджелудочная железа, вены желчного пузыря и селезенки, и краевой синус белой пульпы селезенки (Briskin et al. (1997), *выше*; Kraal et al. , Am. J. Path., 147: 763-771 (1995)).

[0004] В то время как MAdCAM играет физиологическую роль в иммунном надзоре кишечника он, по-видимому, способствует чрезмерной экстравазации лимфоцитов при воспалительном заболевании кишечника в условиях хронического воспаления желудочно-кишечного тракта. TNF α и другие провоспалительные цитокины повышают эндотелиальную экспрессию MAdCAM и в биоптатах, полученных от пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом, присутствует повышение экспрессии MAdCAM в 2-3 раза в областях воспаления (Briskin et al. (1997), Souza et al., Gut, 45:856-63 (1999); Arihiro et al., Pathol Int., 52:367-74 (2002)). Сходные паттерны повышенной экспрессии наблюдаются в экспериментальных моделях колита (Hesterberg et al., Gastroenterology, 111:1373-1380 (1997); Picarella et al., J. Immunol., 158: 2099-2106 (1997); Connor et al., J Leukoc Biol., 65:349-55 (1999); Kato et al., J Pharmacol Exp Ther., 295:183-9 (2000); Hokari et al., Clin Exp Immunol., 26:259-65 (2001); Shigematsu et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 281:G1309-15 (2001)). В других доклинических моделях воспалительных состояний, таких как инсулин-зависимый диабет (Yang et al. Diabetes, 46:1542-7 (1997); Hänninen et al., J Immunol., 160:6018-25 (1998)), реакция "трансплантат

против хозяина" (Fujisaki et al., Scand J Gastroenterol., 38:437-42 (2003), Murai et al., Nat Immunol., 4:154-60 (2003)), хроническое заболевание печени (Hillan et al., Liver, 19:509-18 (1999); Grant et al., Hepatology, 33:1065-72 (2001)), воспалительная энцефалопатия (Stalder et al., Am J Pathol., 153:767-83 (1998); Kanawar et al., Immunol Cell Biol., 78:641-5 (2000)) и гастрит (Barrett et al., J Leukoc Biol., 67:169-73 (2000); Hatanaka et al., Clin Exp Immunol., 130:183-9 (2002)), также происходит возобновление экспрессии фетального MAdCAM и участие активированных $\alpha\beta_{11}$ лимфоцитов в патогенезе заболевания. В этих воспалительных моделях, а также в моделях опосредуемого гаптенем (например, TNBS, DSS и т.д.) или адоптивным переносом ($CD4^+CD45Rb^{high}$) колита на мышах, моноклональное антитело крысы против MAdCAM мыши (mAb), MECA-367, которое блокирует связывание $\alpha\beta_{11}$ лимфоцитов с MAdCAM, снижает привлечение лимфоцитов, экстравазацию в ткани, воспаление и тяжесть заболевания. Также описаны моноклональные антитела мыши (mAb) против MAdCAM человека (см., например, WO 96/24673 и WO 99/58573).

[0005] Учитывая роль MAdCAM в воспалительном заболевании кишечника (IBD) и других воспалительных заболеваниях, ассоциированных с желудочно-кишечным трактом или другими тканями, является желательным средство для ингибирования связывания $\alpha\beta_{11}$ и опосредуемого MAdCAM привлечения лейкоцитов. Кроме того, было бы желательным наличие такого терапевтического средства с преимущественными свойствами, включая, но не ограничиваясь ими, отсутствие нежелательных взаимодействий с другими лекарственными средствами у пациентов и благоприятные физико-химические свойства у человека, такие как величины рК/рD, растворимость, стабильность, срок хранения и время полужизни *in vivo*. Терапевтический белок, такой как антитело, преимущественно является свободным от нежелательных посттрансляционных модификаций или образования агрегатов. Таким образом, существует острая потребность в терапевтических антителах против MAdCAM.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В рамках настоящего изобретения предусматривается выделенное антитело, которое специфически связывает MAdCAM, где по меньшей мере последовательности CDR указанного антитела представляют собой последовательности CDR человека, или антигенсвязывающая часть указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело человека, предпочтительно антитело, которое действует в качестве антагониста MAdCAM. Также предусматриваются композиции, содержащие указанные антитела или части.

[0007] Также изобретение относится к композиции, содержащей тяжелую и/или легкую цепь указанного антитела-антагониста MAdCAM, или вариабельную область или другую его антигенсвязывающую часть, или молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любое из вышеуказанных, и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции по изобретению, кроме того, могут содержать другой компонент, такой как терапевтическое средство или диагностическое средство. Диагностические и терапевтические способы

также охватываются изобретением.

[0008] Кроме того, изобретение относится к выделенной клеточной линии, которая продуцирует указанное антитело против MAdCAM или его антигенсвязывающую часть.

[0009] Также изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим тяжелую и/или легкую цепь указанного антитела против MAdCAM или его вариабельную область или его антигенсвязывающую часть.

[0010] Изобретение относится к векторам и клеткам-хозяевам, содержащим указанные молекулы нуклеиновых кислот, а также к способам рекомбинантной продукции полипептидов, кодируемых молекулами нуклеиновых кислот.

[0011] Также предусматриваются не являющиеся человеком трансгенные животные или растения, которые экспрессируют тяжелую и/или легкую цепь указанного антитела против MAdCAM или его антигенсвязывающей части.

[0012] В некоторых вариантах осуществления предусматривается моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с молекулой клеточной адгезии типа "адрессин" в слизистых оболочках (MAdCAM).

[0013] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающая часть обладает по меньшей мере одним из следующих свойств: (a) связывается с клетками человека; (b) обладает селективностью в отношении MAdCAM, превышающей селективность в отношении VCAM или фибронектина по меньшей мере в 100 раз; (c) связывается с MAdCAM человека с $K_d \times 10^{-10}$ М или менее; или (d) ингибирует связывание клеток, экспрессирующих $\alpha_4\beta_7$, с MAdCAM человека; (e) ингибирует привлечение лимфоцитов в желудочно-кишечную лимфоидную ткань.

[0014] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающая часть связывает MAdCAM человека с $K_d \times 10^{-10}$ М или менее и ингибирует связывание $\alpha_4\beta_7$ с MAdCAM человека.

[0015] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичную SEQ ID NO: 148.

[0016] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 148.

[0017] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит от 1 до 25 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 148.

[0018] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 148.

[0019] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичную SEQ ID NO: 150.

[0020] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 150.

[0021] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от 1 до 25 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 150.

[0022] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 150.

[0023] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичную SEQ ID NO: 148, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичную SEQ ID NO: 150.

[0024] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 148, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 150.

[0025] В некоторых вариантах осуществления предусматривается последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность антитела против MAdCAM.

[0026] В некоторых вариантах осуществления предусматривается клетка, продуцирующая моноклональное антитело человека, которое связывает MAdCAM.

[0027] В некоторых вариантах осуществления предусматривается клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую MAdCAM.

[0028] В некоторых вариантах осуществления предусматривается гибридная клеточная линия, которая продуцирует моноклональное антитело против MAdCAM человека. В некоторых вариантах осуществления гибридома выбрана из группы, состоящей из 1.7.2 (номер доступа ECACC № 03090901), 1.8.2 (номер доступа ECACC № 03090902), 6.14.2 (номер доступа ECACC № 03090903), 6.22.2 (номер доступа ECACC № 03090904), 6.34.2 (номер доступа ECACC № 03090905), 6.67.1 (номер доступа ECACC № 03090906), 6.73.2 (номер доступа ECACC № 03090907), 6.77.1 (номер доступа ECACC № 03090908), 7.16.6 (номер доступа ECACC № 03090909), 7.20.5 (номер доступа ECACC № 03090910), 7.26.4 (номер доступа ECACC № 03090911) и 9.8.2 (номер доступа ECACC № 03090912).

[0029] В некоторых вариантах осуществления предусматривается моноклональное антитело человека, продуцируемое гибридной клеточной линией, или антигенсвязывающая часть указанного моноклонального антитела.

[0030] В некоторых вариантах осуществления С-концевой лизин тяжелой цепи отщепляется.

[0031] В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающая часть ингибирует связывание MAdCAM человека с $\alpha_4\beta_7$, и где антитело или его часть обладает по меньшей мере одним из следующих свойств: (a) перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание с MAdCAM; (b) конкурирует с эталонным антителом за связывание с MAdCAM; (c) связывается с тем же эпитопом MAdCAM, что и у эталонного антитела; (d) связывает MAdCAM по существу с той же K_d , что и эталонное антитело, (e) связывает MAdCAM по существу с той же

скоростью диссоциации, что и эталонное антитело; где эталонное антитело выбрано из группы, состоящей из: моноклонального антитела 1.7.2, моноклонального антитела 1.8.2, моноклонального антитела 6.14.2, моноклонального антитела 6.22.2, моноклонального антитела 6.34.2, моноклонального антитела 6.67.1, моноклонального антитела 6.73.2, моноклонального антитела 6.77.1, моноклонального антитела 7.16.6, моноклонального антитела 7.20.5, моноклонального антитела 7.26.4, моноклонального антитела 9.8.2, моноклонального антитела X481.2, моноклонального антитела 6.22.2-mod, моноклонального антитела 6.34.2-mod, моноклонального антитела 6.67.1-mod, моноклонального антитела 6.77.1-mod и моноклонального антитела 7.26.4-mod.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из: (a) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, без сигнальных последовательностей; (b) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8, без сигнальных последовательностей; (c) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, без сигнальных последовательностей; (d) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 16, без сигнальных последовательностей; (e) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20, без сигнальных последовательностей; (f) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24, без сигнальных последовательностей; (g) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28, без сигнальных последовательностей; (h) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, без сигнальных последовательностей; (i) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36, без сигнальных последовательностей; (j) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 40, без сигнальных последовательностей; (k) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44, без сигнальных последовательностей; (l) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 48, без сигнальных последовательностей; (m) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 54, без сигнальных последовательностей; (n) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58, без сигнальных последовательностей; (o) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 62, без сигнальных последовательностей; (p) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 66, без сигнальных последовательностей; и (q) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 68, без сигнальных последовательностей (r) антитела, содержащего

аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 148 и SEQ ID NO: 150, без сигнальной последовательности.

[0033] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь указанного антитела или его части содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, или легкая цепь содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod.

[0034] В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его части содержат тяжелую цепь, в которой используется ген 1-18 VH человека, ген 3-15 VH человека, ген 3-21 VH человека, ген 3-23 VH человека, ген 3-30 VH человека, ген 3-33 VH человека или ген 4-4 VH человека.

[0035] В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или части содержат легкую цепь, в которой используется ген A2 VK человека, ген A3 VK человека, ген A26 VK человека, ген B3 VK человека, ген O12 VK человека или ген O18 VK человека.

[0036] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, или обе из них являются по меньшей мере на 90% идентичными аминокислотной последовательности соответствующей области или областей моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: моноклонального антитела 1.7.2, моноклонального антитела 1.8.2, моноклонального антитела 6.14.2, моноклонального антитела 6.22.2, моноклонального антитела 6.34.2, моноклонального антитела 6.67.1, моноклонального антитела 6.73.2, моноклонального антитела 6.77.1, моноклонального антитела 7.16.6, моноклонального антитела 7.20.5, моноклонального антитела 7.26.4, моноклонального антитела 9.8.2, моноклонального антитела X481.2, моноклонального антитела 6.22.2-mod, моноклонального антитела 6.34.2-mod, моноклонального антитела 6.67.1-mod, моноклонального антитела 6.77.1-mod и моноклонального антитела 7.26.4-mod.

[0037] В некоторых вариантах осуществления предусматривается моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают MAdCAM, где: (a) тяжелая цепь содержит аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи эталонного антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod, (b) легкая цепь содержит аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи эталонного антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod, (c) антитело содержит тяжелую цепь согласно (a) и легкую цепь согласно (b); и (d) антитело согласно (c), где аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи выбраны из одного и того же эталонного антитела.

[0038] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь, легкая цепь или обе из них содержат аминокислотную последовательность от начала CDR1 до конца CDR3 тяжелой цепи, легкой цепи или обеих из них, соответственно, эталонного антитела.

[0039] В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит: (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2 (SEQ ID NO: 2); 1.8.2 (SEQ ID NO: 6); 6.14.2 (SEQ ID NO: 10); 6.22.2 (SEQ ID NO: 14); 6.34.2 (SEQ ID NO: 18); 6.67.1 (SEQ ID NO: 22); 6.73.2 (SEQ ID NO: 26); 6.77.1 (SEQ ID NO: 30); 7.16.6 (SEQ ID NO: 34); 7.20.5 (SEQ ID NO: 38); 7.26.4 (SEQ ID NO: 42); и 9.8.2 (SEQ ID NO: 46); X481.2 (SEQ ID NO: 148), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 52); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 56); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 60); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 64); и 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 42); (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность вариабельной легкой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2 (SEQ ID NO: 4); 1.8.2 (SEQ ID NO: 8); 6.14.2 (SEQ ID NO: 12); 6.22.2 (SEQ ID NO: 16); 6.34.2 (SEQ ID NO: 20); 6.67.1 (SEQ ID NO: 24); 6.73.2 (SEQ ID NO: 28); 6.77.1 (SEQ ID NO: 32); 7.16.6 (SEQ ID NO: 36); 7.20.5 (SEQ ID NO: 40); 7.26.4 (SEQ ID NO: 44); и 9.8.2 (SEQ ID NO: 48); X481.2 (SEQ ID NO: 150), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 54); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 58); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 62); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 66); и 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 68); или (c) тяжелую цепь согласно (a) и легкую цепь согласно (b).

[0040] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина G (IgG), IgM, IgE и IgA или IgD, гуманизированного антитела, химерного антитела или биспецифического антитела.

[0041] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая часть представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, F_V-фрагмент или одноцепочечное антитело.

[0042] В некоторых вариантах осуществления предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части и фармацевтически приемлемый носитель.

[0043] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий стадию введения указанному индивидууму моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть ингибирует связывание MAdCAM с $\alpha_4\beta_7$.

[0044] В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта.

[0045] В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, дивертикулеза, гастрита, заболевания печени, первичного билиарного склероза и склерозирующего холангита.

[0046] В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание

кишечника представляет собой болезнь Крона, язвенный колит или оба из них.

[0047] В некоторых вариантах осуществления воспалительные заболевания представляют собой инсулинзависимый диабет и реакцию "трансплантат против хозяина".

[0048] В некоторых вариантах осуществления предусматривается выделенная клеточная линия, которая продуцирует моноклональное антитело или антигенсвязывающую часть, или тяжелую цепь или легкую цепь указанного антитела или указанной его части. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия продуцирует антитело, выбранное из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2 и X481.2 или антитела, содержащего аминокислотные последовательности одного из указанных антител. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия продуцирует моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из: 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod, 7.26.4-mod и X481.2 или антитела, содержащего аминокислотные последовательности одного из указанных антител.

[0049] В некоторых вариантах осуществления предусматривается выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела или ее антигенсвязывающую часть, или легкую цепь антитела или ее антигенсвязывающую часть.

[0050] В некоторых вариантах осуществления предусматривается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, где вектор необязательно содержит последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления предусматривается клетка-хозяин, содержащая вектор или молекулу нуклеиновой кислоты.

[0051] В некоторых вариантах осуществления предусматривается клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела или его антигенсвязывающей части.

[0052] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ продуцирования моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающей части, которые специфически связывают MAdCAM, включающий культивирование клетки-хозяина или клеточной линии в подходящих условиях и выделение указанного антитела или его антигенсвязывающей части.

[0053] В некоторых вариантах осуществления предусматривается не являющееся человеком трансгенное животное или трансгенное растение, содержащее (a) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть; (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть; или (c) как (a), так и (b) антитела, где не являющееся человеком трансгенное животное или трансгенное растение экспрессируют указанную тяжелую цепь, или легкую цепь, или обе из них.

[0054] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ

выделения антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с MAdCAM, включающий стадию выделения антитела из не являющегося человеком трансгенного животного или трансгенного растения.

[0055] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ лечения индивидуума, нуждающегося в этом, антителом человека или его антигенсвязывающей частью, которые специфически связываются с MAdCAM и ингибируют связывание с $\alpha_4\beta_7$, включающий стадии: (а) введения эффективного количества выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или молекул нуклеиновых кислот, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь или их антигенсвязывающие части; и (b) экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты.

[0056] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ получения моноклонального антитела человека, которое специфически связывает MAdCAM, включающий стадии: (а) иммунизации не являющегося человеком трансгенного животного, которое способно продуцировать антитела человека, посредством MAdCAM, иммуногенной части MAdCAM, или клетки или ткани, экспрессирующей MAdCAM; и (b) позволения трансгенному животному индуцировать иммунный ответ на MAdCAM.

[0057] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело человека получают, как описано выше.

[0058] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ ингибирования связывания $\alpha_4\beta_7$ с клетками, экспрессирующими MAdCAM человека, включающий приведение клеток в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0059] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ ингибирования опосредуемой MAdCAM адгезии лейкоцит-эндотелиальная клетка, включающий приведение эндотелиальных клеток в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0060] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ ингибирования опосредуемой MAdCAM адгезии, миграции и инфильтрации лейкоцитов в ткани, включающий стадию приведения эндотелиальных клеток в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0061] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ ингибирования зависимой от $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM клеточной адгезии, включающий стадию приведения клеток, экспрессирующих MAdCAM человека, в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0062] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ ингибирования опосредуемого MAdCAM привлечения лимфоцитов в желудочно-кишечную лимфоидную ткань, включающий стадию приведения клеток,

экспрессирующих MAdCAM человека, в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0063] В некоторых вариантах осуществления предусматривается моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают MAdCAM, где указанное антитело или его часть содержат одну или несколько из аминокислотных последовательностей FR1, FR2, FR3 или FR4 моноклонального антитела человека, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod.

[0064] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающая часть содержат: (a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod; (b) аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod; (c) как (a), так и (b); или (d) любой из (a), (b) или (c), с сигнальной последовательностью или без нее.

[0065] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ диагностики нарушения, характеризующегося циркулирующим растворимым MAdCAM человека, включающий стадии: (1) приведения биологического образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью, и (2) детекции связывания.

[0066] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ обнаружения воспаления у индивидуума, включающий стадии: (1) введения указанному индивидууму моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, где указанное антитело или его часть являются мечеными поддающейся детекции меткой, и (2) детекции связывания.

[0067] В некоторых вариантах осуществления предусматривается диагностический набор, содержащий моноклональное антитело или антигенсвязывающую часть.

[0068] В некоторых вариантах осуществления предусматривается фармацевтическая композиция, дополнительно содержащая одно или несколько дополнительных противовоспалительных или иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько дополнительных противовоспалительных или иммуномодулирующих средств выбраны из группы, состоящей из: кортикостероидов, аминосалицилатов, азатиоприна, метотрексата, циклоспорина, FK506, IL-10, GM-CSF, рапамицина, средств, направленных против TNF α ,

и антагонистов молекул адгезии.

[0069] В некоторых вариантах осуществления предусматривается вакцина, содержащая эффективное количество антитела человека или его антигенсвязывающей части, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления вакцина является мукозальной.

[0070] В некоторых вариантах осуществления предусматривается способ определения эффекта введения ингибиторного антитела против MAdCAM или его антигенсвязывающей части индивидууму, включающий стадии: (a) введения индивидууму моноклонального антитела человека, которое специфически связывается с MAdCAM; и (b) определения того, происходит ли повышение уровней циркулирующих экспрессирующих $\alpha_4\beta_7$ лейкоцитов. В некоторых вариантах осуществления указанные лейкоциты представляют собой лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления указанное повышение уровней циркулирующих экспрессирующих $\alpha_4\beta_7$ лейкоцитов определяют с использованием FACS-анализа.

[0071] В некоторых вариантах осуществления предусматриваются моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связывают MAdCAM, содержащие переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 150 и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 148.

[0072] В некоторых вариантах осуществления предусматриваются моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связывают MAdCAM, содержащие переменную область тяжелой цепи, кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 149, и переменную область легкой цепи, кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 35.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0073] На фиг.1 (т.е. на фиг.1A-фиг.1T) представлено выравнивание спрогнозированных аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи каппа двенадцати моноклональных антител человека против MAdCAM с эталонными аминокислотными последовательностями соответствующих генов человека.

[0074] На фиг.1A представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антител 1.7.2 и 1.8.2 с продуктом гена 3-15 VH эмбрионального типа человека.

[0075] На фиг.1B представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 6.14.2 с продуктом гена 3-23 VH эмбрионального типа человека.

[0076] На фиг.1C представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 6.22.2 с продуктом гена 3-33 VH эмбрионального типа человека.

[0077] На фиг.1D представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 6.34.2 с продуктом гена 3-30 VH

эмбрионального типа человека.

[0078] На фиг. 1E представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 6.67.1 с продуктом гена 4-4 VH эмбрионального типа человека.

[0079] На фиг. 1F представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 6.73.2 с продуктом гена 3-23 VH эмбрионального типа человека.

[0080] На фиг. 1G представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 6.77.1 с продуктом гена 3-21 VH эмбрионального типа человека.

[0081] На фиг. 1H представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 7.16.6 и 7.26.4 с продуктом гена 1-18 VH эмбрионального типа человека.

[0082] На фиг. 1I представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 7.20.5 с продуктом гена 4-4 VH эмбрионального типа человека.

[0083] На фиг. 1J представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 9.8.2 с продуктом гена 3-33 VH эмбрионального типа человека.

[0084] На фиг. 1K представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антител 1.7.2 и 1.8.2 с продуктом гена A3 эмбрионального типа человека.

[0085] На фиг. 1L представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 6.14.2 с продуктом гена O12 эмбрионального типа человека.

[0086] На фиг. 1M представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 6.22.2 с продуктом гена A26 эмбрионального типа человека.

[0087] На фиг. 1N представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 6.34.2 с продуктом гена O12 эмбрионального типа человека.

[0088] На фиг. 1O представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 6.67.1 с продуктом гена B3 эмбрионального типа человека.

[0089] На фиг. 1P представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 6.73.2 с продуктом гена O12 эмбрионального типа человека.

[0090] На фиг. 1Q представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 6.77.1 с продуктом гена A2 эмбрионального типа человека.

[0091] На фиг.1R представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антител 7.16.6 и 7.26.4 с продуктом гена A2 эмбрионального типа человека.

[0092] На фиг.1S представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 7.20.5 с продуктом гена A3 эмбрионального типа человека.

[0093] На фиг.1T представлено выравнивание спрогнозированной аминокислотной последовательности легкой цепи каппа для антитела 9.8.2 с продуктом гена O18 эмбрионального типа человека.

[0094] На фиг.2 (т.е. фиг.2A и фиг.2B) представлено выравнивание с использованием CLUSTAL спрогнозированных аминокислотных последовательностей тяжелых цепей и легких цепей каппа антител человека против MAdCAM.

[0095] На фиг.2A представлено выравнивание с использованием CLUSTAL и радиальное древо для спрогнозированных аминокислотных последовательностей легких цепей каппа, демонстрирующие сходство между легкими цепями каппа антитела против MAdCAM.

[0096] На фиг.2B представляет собой выравнивание с использованием CLUSTAL и радиальное древо спрогнозированных аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, демонстрирующие степень сходства между тяжелыми цепями антител против MAdCAM.

[0097] На фиг.3 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей CLUSTAL для 2 N-концевых доменов MAdCAM яванского макака и человека, которые образуют связывающий домен $\alpha_4\beta_7$. β -цепи выровнены в соответствии с Tan et al., Structure (1998) 6:793-801.

[0099] На фиг.5 представлено двухмерное графическое изображение на основе данных, приведенных в таблице 7, в отношении разнообразия эпитопов MAdCAM, с которыми связываются антитела против MAdCAM 1.7.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2. Антитела против MAdCAM в одном и том же круге демонстрируют один и тот же профиль реактивности, принадлежат одной и той же группе эпитопов и вероятно будут распознавать один и тот же эпитоп на MAdCAM. Клоны антител MAdCAM в перекрывающихся кругах не способны связываться одновременно и, таким образом, вероятно будут распознавать перекрывающиеся эпитопы на MAdCAM. Не перекрывающиеся круги соответствуют клонам антител против MAdCAM с различным пространственным распределением эпитопов.

[0100] На фиг.6 представлены данные сэндвич-ELISA с антителами против MAdCAM 1.7.2 и меченым Alexa 488 7.16.6, демонстрирующие, что два антитела, которые способны выявлять различные эпитопы на MAdCAM, можно использовать для детекции растворимого MAdCAM для диагностических целей.

[0101] На фиг.7 представлен эффект ингибиторного антитела против MAdCAM (1 мг/кг) на количество циркулирующих периферических $\alpha_4\beta_7^+$ лимфоцитов, выраженный в

качестве кратного повышения относительно контрольного IgG2a mAb или носителя с использованием mAb против MAdCAM 7.16.6 в модели на яванских макаках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения и основные термины

[0102] Если в настоящем описании не определено иначе, научные и технические термины, используемые в отношении настоящего описания, имеют значения, обычно подразумеваемые специалистом в данной области. Кроме того, если контекстом не требуется иное, термины в форме единственного числа включают термины в форме множественного числа, и термины в форме множественного числа включают термины в форме единственного числа. В основном номенклатура, используемая применительно к культивированию клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанным в настоящем описании, и их технологиям, представляет собой номенклатуру, хорошо известную и часто используемую в данной области. Способы и технологии по настоящему изобретению обычно проводят в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области, и как описано в различных общих и более конкретных источниках литературы, которые цитированы и обсуждаются на протяжении настоящего описания, если нет иных указаний. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок. Ферментативные реакции и способы очистки проводят в соответствии с указаниями изготовителя, как часто осуществляют в данной области или как описано в настоящем описании. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического получения, составления и доставки, и лечения пациентов используют стандартные способы.

[0103] Следует понимать, что следующие термины, если нет иных указаний, имеют следующие значения:

[0104] Термин "полипептид" охватывает нативные или искусственные белки, фрагменты белков и полипептидные аналоги белковой последовательности. Полипептид может быть мономерным или полимерным.

[0105] Термин "выделенный белок" или "выделенный полипептид" относится к белку или полипептиду, который вследствие его источника или области происхождения (1) не ассоциирован с естественным образом ассоциированными компонентами, которые сопровождают его в его нативном состоянии, (2) свободен от других белков того же вида, (3) экспрессируется клеткой отличающегося вида, или (4) не встречается в природе. Таким образом, полипептид, который химически синтезирован или синтезирован в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он естественным образом происходит, является "выделенным" из его естественным образом ассоциированных компонентов. Белок также

можно делать по существу свободным от естественным образом ассоциированных компонентов посредством выделения с использованием способов очистки белков, хорошо известных в данной области.

[0106] Белок или полипептид является "по существу чистым", "по существу гомогенным" или "по существу очищенным", когда по меньшей мере приблизительно 60-75% образца содержат один тип полипептида. Полипептид или белок может быть мономерным или мультимерным. По существу чистый полипептид или белок, как правило, составляет приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% масс./масс. белка в образце, чаще приблизительно 95%, и предпочтительно он является более чем на 99% чистым. Чистоту или гомогенность белка можно определять рядом способов, хорошо известных в данной области, таких как полиакриламидный гель-электрофорез образца белка с последующей визуализацией единой полипептидной полосы при окрашивании геля красителем, хорошо известным в данной области. Для определенных целей может быть обеспечено более высокое разрешение с использованием ВЭЖХ или других способов очистки, хорошо известных в данной области.

[0107] Термин "полипептидный фрагмент", как используют в рамках изобретения, относится к полипептиду, который имеет N-концевую и/или C-концевую делецию, но где остальная аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям во встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления, фрагменты имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот. В других вариантах осуществления фрагменты имеют длину по меньшей мере 14 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот, обычно по меньшей мере 50 аминокислот, еще более предпочтительно по меньшей мере 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот.

[0108] Термин "полипептидный аналог", как используют в рамках изобретения, относится к полипептиду, который содержит сегмент по меньшей мере из 25 аминокислот, который имеет значительную идентичность с частью аминокислотной последовательности и который обладает по меньшей мере одним из следующих свойств: (1) специфическое связывание с MAdCAM в подходящих условиях связывания, (2) способность ингибировать связывание интегрина $\alpha\beta_1$ и/или L-селектина с MAdCAM, или (3) способность снижать экспрессию MAdCAM на клеточной поверхности *in vitro* или *in vivo*. Как правило, полипептидные аналоги содержат консервативную аминокислотную замену (или инсерцию или делецию) относительно встречающейся в природе последовательности. Аналоги, как правило, имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот или более, и часто могут иметь такую же длину, как и полноразмерный встречающийся в природе полипептид.

[0109] Предпочтительными аминокислотными заменами являются замены, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания в отношении образования белковых

комплексов, (4) изменяют аффинность связывания или (5) сообщают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутации последовательности, отличные от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, во встречающуюся в природе последовательность можно вносить единичные или множественные аминокислотные замены (предпочтительно консервативные аминокислотные замены) (предпочтительно в части полипептида вне домена(ов), образующего межмолекулярные контакты. Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замена аминокислоты на должна иметь тенденцию к разрушению спирали, которая присутствует в исходной последовательности, или к разрушению других типов вторичной структуры, которые характеризуют исходную последовательность). Примеры известных в данной области вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al., *Nature*, 354:105 (1991), все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[0110] Часто в фармацевтической промышленности в качестве лекарственных средств используются пептидные аналоги со свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Эти типы непептидных соединений называют "пептидными миметиками" или "пептидомиметиками". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.*, 15:29(1986); Veber and Freidinger, *TINS*, p.392(1985); и Evans et al., *J. Med. Chem.*, 30:1229(1987), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок. Такие соединения часто разрабатывают с помощью компьютеризованного молекулярного моделирования. Пептидные миметики, которые структурно сходны с терапевтически полезными пептидами, можно использовать для достижения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. Как правило, пептидомиметики являются структурно сходными с эталонным полипептидом (т.е. полипептид, который обладает желаемым биохимическим свойством или фармакологической активностью), таким как антитело человека, но имеет одну или несколько пептидных связей, необязательно замененных такой связью, как: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (цис и транс), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{SO}-$, способами, хорошо известными в данной области. Также для получения более стабильных пептидов можно использовать систематическую замену одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности на D-аминокислоту того же типа (например, D-лизин вместо L-лизина). Кроме того, ограниченные связями пептиды, содержащие консенсусную последовательность или по существу идентичный консенсусной последовательности вариант, можно получать способами, известными в данной области (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), включенная в настоящее описание в качестве ссылки); например, путем присоединения внутренних остатков цистеина, способных образовывать межмолекулярные дисульфидные мостики,

которые обеспечивают циклизацию пептида.

[0111] "Иммуноглобулин" представляет собой тетрамерную молекулу. Во встречающемся в природе иммуноглобулине каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область размером приблизительно 100-110 или более аминокислот, в основном ответственную за распознавание антигена. С-концевая часть каждой цепи определяют константную область, в основном ответственную за эффекторную функцию. Легкие цепи человека подразделяют на легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи подразделяют на μ , δ , γ , α или ϵ , и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA, и IgE, соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены областью "J" приблизительно из 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает область "D" приблизительно из 10 или более аминокислот. См., главным образом, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включенную в качестве ссылки в полном объеме для любых целей). Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют связывающий центр антитела, так что интактный иммуноглобулин имеет два участка связывания.

[0112] Цепи иммуноглобулинов имеют одинаковую общую структуру из относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. CDR из двух цепей каждой пары находятся параллельно каркасным областям, образуя эпитоп-специфический связывающий центр. От N-конца к С-концу, как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Принадлежность аминокислоты к каждому из доменов определяют в соответствии с определениями Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917(1987); Chothia et al., *Nature*, 342:878-883(1989), каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0113] "Антитело" относится к интактному иммуноглобулину или к его антигенсвязывающему центру, которые конкурируют с интактным антителом за специфическое связывание. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой его антигенсвязывающую часть. Антигенсвязывающие части можно получать способами рекомбинантных ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие части включают, среди прочего, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb, и фрагменты определяющих комплементарность областей (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диантитела и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для обеспечения специфического связывания антигена с полипептидом. Fab-фрагмент представляет собой одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH,

CL и CH1; F(ab)₂-фрагмент представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент состоит из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент состоит из доменов VL и VH одного плеча антитела; и dAb-фрагмент (Ward et al., *Nature*, 341:544-546(1989)) состоит из VH-домена.

[0114] Как используют в рамках изобретения, антитело, которое обозначают, например, как 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2 или X481.2, представляет собой моноклональное антитело, которое продуцируется гибридомой, имеющей то же название. Например, антитело 1.7.2 продуцируется гибридомой 1.7.2. Антитело, которое обозначают как 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod, 7.26.4-mod или X481.2, представляет собой моноклональное антитело, последовательность которого модифицирована относительно ее исходной последовательности сайт-направленным мутагенезом.

[0115] Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антитело, в котором области VL и VH спарены с образованием одновалентной молекулы с использованием синтетического линкера, который позволяет получение их в качестве единой белковой цепи (Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988)). Диантитела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами одной цепи, тем самым вынуждая домены образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих центра (см., например, Holliger, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) и Poljak, R. J., et al., *Structure*, 2:1121-1123 (1994)). Одна или несколько CDR из антитела по изобретению может быть включена в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно, образуя иммуноадгезин, который специфически связывается с MAdCAM. Иммуноадгезин может включать CDR (несколько CDR) в качестве части более крупной полипептидной цепи, в нем может быть ковалентно связаны CDR (несколько CDR) с другой полипептидной цепью, или он может включать CDR (несколько CDR) нековалентным образом. CDR позволяют специфическое связывание иммуноадгезина с конкретным представляющим интерес антигеном.

[0116] Антитело может иметь один или несколько связывающих центров. Если существует более одного связывающего центра, участки связывания могут быть идентичными или могут различаться. Например, встречающийся в природе иммуноглобулин имеет два идентичных участка связывания, одноцепочечное антитело или Fab-фрагмент имеют один, в то время как "биспецифическое" или "бифункциональное" антитело (диантитело) имеют два различных участка связывания.

[0117] "Выделенное антитело" представляет собой антитело, которое (1) не ассоциировано с компонентами, с которыми оно ассоциировано в природе, включая другие антитела, с которыми оно ассоциировано в природе, которые сопровождают его в его нативном состоянии, (2) свободно от других белков того же вида, (3) экспрессируется

клеткой другого вида или (4) не встречается в природе. Примеры выделенных антител включают антитело против MAdCAM, подвергнутое аффинной очистки с использованием MAdCAM, антитело против MAdCAM, продуцированное гибридомой или другой клеточной линией *in vitro*, и антитело человека против MAdCAM, происходящее из трансгенного животного или растения.

[0118] Как используют в рамках изобретения, термин "антитело человека" означает антитело, в котором последовательности вариабельной и константной области представляют собой последовательности человека. Также термин охватывает антитела с последовательностями, происходящими из генов человека, но которые изменены, например, для снижения возможной иммуногенности, повышения аффинности, устранения остатков цистеина или участков гликозилирования, которые могут вызывать нежелательное сворачивание, и т.д. Термин охватывает такие антитела, продуцированные рекомбинантным образом в не являющихся человеческими клетках, которые могут обеспечивать гликозилирование, не типичное для клеток человека. Также термин охватывает антитела, индуцированные в трансгенной мыши, которые содержат некоторые или все из локусов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов человека.

[0119] В одном аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело представляет собой антитело, которое происходит из вида, не являющегося человеком, в котором в определенные аминокислоты каркасных и константных доменов тяжелой и легкой цепи внесены мутации для предотвращения или устранения иммунного ответа у человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело можно получать путем слияния константных доменов из антитела человека с вариабельными доменами вида, не являющегося человеком. Примеры того, как получать гуманизированные антитела, могут быть найдены в патентах США № 6054297, 5886152 и 5877293. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против MAdCAM по изобретению содержит аминокислотную последовательность одной или нескольких каркасных областей одного или нескольких антител человека против MAdCAM по изобретению.

[0120] В другом аспекте изобретение относится к "химерному антителу". В некоторых вариантах осуществления химерное антитело относится к антителу, которое содержит одну или несколько областей из одного антитела и одну или несколько областей из одного или нескольких других антител. В предпочтительном варианте осуществления одна или несколько CDR происходят из антитела человека против MAdCAM по изобретению. В более предпочтительном варианте осуществления все CDR происходят из антитела человека против MAdCAM по изобретению. В другом предпочтительном варианте осуществления CDR из одного антитела человека против MAdCAM по изобретению являются смешенными и подобранными в химерном антителе. Например, химерное антитело может содержать CDR1 из легкой цепи первого антитела человека против MAdCAM, которое может быть комбинировано с CDR2 и CDR3 из легкой цепи второго антитела человека против MAdCAM, и CDR из тяжелой цепи могут происходить

из третьего антитела против MAdCAM. Кроме того, каркасные области могут происходить из одного антитела против MAdCAM, из одного или нескольких различных антител, таких как антитело человека, или из гуманизированного антитела.

[0121] "Нейтрализующее антитело", "ингибиторное антитело" или антитело-антагонист представляет собой антитело, которое ингибирует связывание $\alpha_1\beta_1$ или клеток, экспрессирующих $\alpha_1\beta_1$, или любого другого собственного лиганда или клеток, экспрессирующих собственный лиганд, с MAdCAM по меньшей мере приблизительно на 20%. В предпочтительном варианте осуществления антитело снижает и/или ингибирует связывание интегрин $\alpha_1\beta_1$ или клеток, экспрессирующих $\alpha_1\beta_1$, с MAdCAM по меньшей мере на 40%, более предпочтительно на 60%, еще более предпочтительно на 80%, 85%, 90%, 95% или 100%. Снижение связывания можно определять любым из способов, известных специалисту в данной области, например, при определении посредством конкурентного анализа связывания *in vitro*. Пример определения снижения связывания экспрессирующих $\alpha_1\beta_1$ клеток с MAdCAM приведен в примере I.

[0122] Фрагменты или аналоги антител могут быть без труда получены специалистами в данной области согласно указаниям настоящего описания. Предпочтительные N- и C-концевые фрагменты или аналоги находятся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных о нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или частными базами данных. Предпочтительно используют компьютеризованные способы сравнения для идентификации мотивов последовательности или спрогнозированных конформационных доменов белков, которые встречаются в других белках известной структуры и/или функции. Способы идентификации последовательностей белков, которые укладываются в известную трехмерную структуру, известны (Bowie et al., *Science*, 253:164 (1991)).

[0123] Термин "поверхностный плазмонный резонанс", как используют в рамках изобретения, относится к оптическому явлению, которое позволяет анализ биоспецифических взаимодействий в реальном времени путем детекции изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Для более подробного описания см. Jonsson, U., et al., *Ann. Biol. Clin.*, 51:19-26 (1993); Jonsson, U., et al., *Biotechniques*, 11:620-627 (1991); Johnsson, B., et al., *J. Mol. Recognit.*, 8:125-131 (1995); и Johnsson, B., et al., *Anal. Biochem.*, 198:268-277 (1991).

[0124] Термин " k_{off} " относится к константе скорости диссоциации для диссоциации антитела от комплекса антитело/антиген.

[0125] Термин " K_d " относится к константе диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Антитело считают связывающимся с антигеном, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 10 нМ.

[0126] Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором или иным образом взаимодействовать с молекулой. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи углеводов, и обычно имеют определенные трехмерные структурные характеристики, а также определенные зарядовые характеристики. Эпитоп может быть "линейным" или "конформационным". В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) находятся линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия находятся в аминокислотных остатках на белке, которые отделены друг от друга.

[0127] Как используют в рамках изобретения, двадцать общепринятых аминокислот и их сокращенные обозначения соответствуют общепринятому употреблению. См. *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Также пригодными компонентами полипептидов по настоящему изобретению могут быть стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати общепринятых аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α,α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты. Примеры нетрадиционных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N, N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, s-N-метиларгинин и другие сходны аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептида, используемого в настоящем описании, направление влево представляет собой направление к N-концу, и направление вправо представляет собой направление к C-концу, в соответствии со стандартным употреблением и принятыми правилами.

[0128] Термин "полинуклеотид", как указано в настоящем описании, означает полимерную форму нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований, либо рибонуклеотидов, либо дезоксинуклеотидов, или модифицированной формы любых типов нуклеотидов. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

[0129] Термин "выделенный полинуклеотид", как используют в рамках изобретения, означает полинуклеотид геномного происхождения, из кДНК или синтетического происхождения, или некоторую их комбинацию, причем этот "выделенный полинуклеотид" по своему происхождению (1) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" встречается в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе в качестве части более крупной последовательности.

[0130] Термин "олигонуклеотид", упоминаемый в настоящем описании, включает встречающиеся в природе и модифицированные нуклеотиды, связанные вместе

встречающимися в природе и не встречающимися в природе олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подгруппу полинуклеотидов, обычно имеющих длину 200 оснований или меньше. Предпочтительно олигонуклеотиды имеют длину 10-60 оснований и наиболее предпочтительно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Обычно олигонуклеотиды являются одноцепочечными, например, в случае зондов; хотя олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, для применения для конструирования мутанта гена. Олигонуклеотиды по изобретению могут представлять собой либо смысловые, либо антисмысловые олигонуклеотиды.

[0131] Термин "встречающиеся в природе нуклеотиды", упоминаемые в настоящем описании, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", упоминаемый в настоящем описании, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т.п. Термин "олигонуклеотидные связи", упоминаемый в настоящем описании, включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротриоат, фосфородитриоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотриоат, фосфоранилидат, фосфороамидат и т.п. См., например, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077(1984); Stein et al., Nucl. Acids Res., 16:3209(1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539(1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991)); Stec et al., патент США № 5.151.510; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews, 90:543(1990), содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Если желательно, олигонуклеотид может включать метку для детекции.

[0132] "Функционально связанные" последовательности включают как последовательности контроля экспрессии, которые являются смежными с представляющим интерес геном, так и последовательности контроля экспрессии, которые имеют транс-действие или действие на расстоянии для контроля представляющего интерес гена. Термин "последовательность контроля экспрессии", как используют в рамках изобретения, относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для обеспечения экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации, терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, если желательно, последовательности которые усиливают секрецию белка. Природа таких последовательностей контроля различается в зависимости от организма-хозяина; у прокариот такие последовательности контроля обычно включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, как

правило, такие последовательности контроля включают промоторы и последовательность терминирования транскрипции. Подразумевают, что термин "последовательности контроля" включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, а также включает дополнительные компоненты, присутствие которых является преимущественным, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию.

[0133] Термин "вектор", как используют в рамках изобретения, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора является "плаزمид", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть встроены путем лигирования дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть встроены путем лигирования в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный ориджин репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут встраиваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, тем самым, могут реплицироваться вместе с геномом клетки-хозяина. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют в настоящем описании "рекомбинантными экспрессирующими векторами" (или просто "экспрессирующими векторами"). Как правило, экспрессирующие векторы, пригодные в способах рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании термины "плаزمид" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазмид является наиболее часто используемой формой вектора. Однако изобретение подразумевает включение других таких форм экспрессирующих векторов, таких как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектом репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

[0134] Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин"), как используют в рамках изобретения, относится к клетке, в которую введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что под такими терминами подразумевается не только конкретная рассматриваемая клетка, но также и потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в предшествующих поколениях вследствие либо мутации, либо влияний внешней среды, такое потомство, в действительности, может не быть идентичным исходной клетке, но все еще может входить в объем термина "клетка-хозяин", как используют в рамках изобретения.

[0135] Термен "селективно гибридизуется", упоминаемый в настоящем описании, означает поддающееся обнаружению и специфическое связывание. Полинуклеотиды, олигонуклеотиды и их фрагменты в соответствии с изобретением селективно гибридизуются с цепями нуклеиновых кислот в условиях гибридизации и промывания,

которые минимизируют поддающиеся обнаружению уровни связывания с неспецифическими нуклеиновыми кислотами. Условия "высокой жесткости" или "в высокой степени жесткие" условия можно использовать для достижения селективных условий гибридизации, как известно в данной области и как рассмотрено в настоящем описании. Примером условий "высокой жесткости" или "в высокой степени жестких" условий является способ инкубации полинуклеотида с другим полинуклеотидом, где один полинуклеотид может быть фиксирован к твердой поверхности, такой как мембрана, в буфере для гибридизации из 6X SSPE или SSC, 50% формамида, 5X реагента Денхардта, 0,5% SDS, 100 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося при температуре гибридизации 42°C в течение 12-16 часов, с последующим промыванием два раза при 55°C с использованием промывочного буфера из 1X SSC, 0,5% SDS. Также см. Sambrook et al., выше, pp. 9.50-9.55.

[0136] Термин "процентная идентичность последовательностей" в контексте нуклеотидных последовательности относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании на максимальное соответствие. Длина сравнения идентичности последовательностей может соответствовать участку по меньшей мере приблизительно из девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно 18 нуклеотидов, чаще по меньшей мере приблизительно 24 нуклеотидов, как правило, по меньшей мере приблизительно 28 нуклеотидов, более конкретно по меньшей мере приблизительно 32 нуклеотидов и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 36, 48 или более нуклеотидов. Существует ряд различных алгоритмов, известных в данной области, которые можно использовать для определения идентичности нуклеотидных последовательностей. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием FASTA, Gap или Bestfit, которые представляют собой программы Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys, San Diego, CA. FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей для областей наилучшего перекрытия между последовательностью запроса и последовательностями поиска (Pearson, *Methods Enzymol.*, 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.*, 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.*, 276: 71-84 (1998); включенные в настоящее описание в качестве ссылок). Если нет иных указаний, используют параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процентную идентичность последовательностей между нуклеотидными последовательностями можно определять с использованием FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова *b* и фактор NOPAM для оценочной матрицы) или с использованием Gap с параметрами по умолчанию, как предоставлено в Wisconsin Package Version 10.3, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

[0137] Указание на нуклеотидную последовательность охватывает комплементарную ей последовательность, если нет иных указаний. Таким образом, следует понимать, что указание на молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую

конкретную последовательность, охватывает комплементарную ей цепь с ее комплементарной последовательностью.

[0138] В области молекулярной биологии исследователи используют термины "процентная идентичность последовательностей", "процентное сходство последовательностей" и "процентная гомология последовательностей" взаимозаменяемо. В настоящей заявке эти термины имеют одинаковое значение в отношении только нуклеотидных последовательностей.

[0139] Термин "значительное сходство" или "значительное сходство последовательностей" при указании на нуклеиновую кислоту или ее фрагмент указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей цепью), существует идентичность нуклеотидных последовательностей, составляющая по меньшей мере приблизительно 85%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований при определении с использованием любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как рассмотрено выше.

[0140] При применении к полипептидам термин "значительная идентичность" означает, что две пептидных последовательности при оптимальном выравнивании, например, посредством программ GAP или BESTFIT с использованием веса пропуска по умолчанию, обладают по меньшей мере 75% или 80% идентичностью последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, различаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). Как правило, консервативная аминокислотная замена по существу не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процентную идентичность последовательностей или степень сходства можно корректировать вверх для внесения поправки на консервативную природу замены. Способы проведения этой коррекции хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 24: 307-31 (1994), включенную в настоящее описание в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксилсодержащие боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые

цепи: лизин, аргинин и гистидин; и б) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы замен консервативных аминокислот представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

[0141] Альтернативно консервативная замена представляет собой любую замену, имеющую положительную величину в логарифмической матрице вероятности PAM250, описанной в Gonnet et al., *Science*, 256: 1443-45 (1992), включенной в настоящее описание в качестве ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее не отрицательную величину в логарифмической матрице вероятностей PAM250.

[0142] Сходство последовательностей для полипептидов обычно определяют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков подбирает сходные последовательности с использованием показателей сходства, приписываемых различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, GCG включает такие программы, как "Gap" и "Bestfit", которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей в высокой степени родственных полипептидов, таких как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, Wisconsin package Version 10.3. Полипептидные последовательности также можно сравнивать посредством FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программы из пакета Wisconsin package Version 10.3. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивают выравнивание и процентную идентичность последовательностей областей, которые наилучшим образом перекрываются между последовательностями запроса и поиска (Pearson (1990); Pearson (2000)). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно blastp или tblastn, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997); включенную в настоящее описание в качестве ссылки.

[0143] Длина полипептидных последовательностей, сравниваемых в отношении гомологии, как правило, составляет по меньшей мере приблизительно 16 аминокислотных остатков, обычно по меньшей мере приблизительно 20 остатков, чаще по меньшей мере приблизительно 24 остатков, как правило, по меньшей мере приблизительно 28 остатков, и предпочтительно более чем приблизительно 35 остатков. При поиске в базе данных, содержащей последовательности из большого количества различных организмов, является предпочтительным сравнение аминокислотных последовательностей.

[0144] Как используют в рамках изобретения, термины "метка" или "меченый"

относятся к включению другой молекулы в антитело. В одном варианте осуществления метка представляет собой поддающийся обнаружению маркер, например, включение радиоактивно меченой аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных частей, которые можно обнаруживать посредством меченого авидина (например, стрептавидин, содержащий флуоресцентный маркер или обладающий ферментативной активностью, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими способами). В другом варианте осуществления метка или маркер могут быть терапевтическими, например, могут представлять собой конъюгат лекарственного средства или токсин. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновых молний, участки связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки), магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацин дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки присоединены через спейсерные плечи различной длины для снижения потенциального пространственного препятствования.

[0145] Термин "средство" используют в настоящем описании для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, изготовленного из биологических материалов. Термин "фармацевтическое средство или лекарственное средство", как используют в рамках изобретения, относится к химическому соединению или композиции, способным индуцировать требуемый терапевтический эффект, когда их надлежащим образом вводят пациенту. Другие химические термины в настоящем описании используются в соответствии с общепринятым употреблением в данной области, как проиллюстрировано в *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), включенной в настоящее описание в качестве ссылки).

[0146] Термин "противовоспалительное" или "иммуномодулирующее" средство используют в настоящем описании для обозначения средств, которые обладают функциональным свойством ингибирования воспаления, включая воспалительное заболевание у индивидуума, в том числе у человека. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения воспалительное заболевание может представлять

собой, но не ограничивается ими, воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта, включая болезнь Крона, язвенный колит, дивертикулез, гастрит, заболевание печени, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит. Воспалительные заболевания также включают, но не ограничиваются ими, заболевание живота (включая перитонит, аппендицит, заболевание желчных путей), острый поперечный миелит, аллергический дерматит (включая аллергическую кожу, аллергическую экзему, кожную атопию, атопическую экзему, атопический дерматит, кожное воспаление, воспалительную экзему, воспалительный дерматит, кожную реакцию на укусы мелких насекомых, милиарный дерматит, милиарную экзему, кожную реакцию на клеща домашней пыли), анкилозирующий спондилит (синдром Рейтера), астму, воспаление дыхательных путей, атеросклероз, артериосклероз, атрезию желчевыводящих путей, воспаление мочевого пузыря, рак молочной железы, сердечно-сосудистое воспаление (включая васкулит, ревматоидный инфаркт ногтевой кожицы, изъязвления ног, полимиозит, хроническое сосудистое воспаление, перикардит, хроническое обструктивное заболевание легких), хронический панкреатит, периневральное воспаление, колит (включая амебный колит, инфекционный колит, бактериальный колит, колит Крона, ишемический колит, язвенный колит, идиопатический проктоколит, воспалительное заболевание кишечника, псевдомембранозный колит), коллагеновые сосудистые нарушения (ревматоидный артрит, SLE, прогрессирующая системная склеродермия, смешанное заболевание соединительной ткани, сахарный диабет), болезнь Крона (регионарный энтерит, гранулематозный илеит, илеоколит, воспаление пищеварительной системы), демиелинизирующее заболевание (включая миелит, рассеянный склероз, диссеминированный склероз, острый диссеминированный энцефаломиелит, перивенозная демиелинизация, дефицит витамина B12, синдром Гийена-Барре, MS-ассоциированный ретровирус), дерматомиозит, дивертикулит, экссудативную диарею, гастрит, гранулематозный гепатит, гранулематозное воспаление, холецистит, инсулинзависимый сахарный диабет, воспалительные заболевания печени (фиброз печени, первичный билиарный цирроз, гепатит, склерозирующий холангит), воспаление легких (идиопатический фиброз легких, эозинофильная гранулема легкого, легочный гистиоцитоз X, перибронхиолярное воспаление, острый бронхит), венерическую лимфогранулему, злокачественную меланому, заболевание полости рта/зубов (включая гингивит, периодонтальное заболевание), мукозит, воспаление скелетно-мышечной системы (миозит), неалкогольный стеатогепатит (неалкогольная жировая инфильтрация печени), глазное и глазничное воспаление (включая увеит, оптический неврит, периферическое ревматоидное изъязвление, периферическое воспаление роговицы), остеоартрит, остеомиелит, фарингальное воспаление, полиартрит, проктит, псориаз, радиационное поражение, саркоидоз, серповидноклеточную некропатию, поверхностный тромбофлебит, синдром системного воспалительного ответа, тиреоидит, системную красную волчанку, реакцию "трансплантат против хозяина", острую ожоговую травму, синдром Бехчета, синдром Шегрена.

[0147] Термины "пациент" и "индивидуум" включают человека и ветеринарных индивидуумов.

Антитела человека против MAdCAM и их охарактеризация

[0148] В одном варианте осуществления изобретение относится к антителам против MAdCAM, содержащим последовательности CDR человека. В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителам человека против MAdCAM. В некоторых вариантах осуществления антитела человека против MAdCAM получают путем иммунизации не являющегося человеком трансгенного животного, например, грызуна, чей геном содержит гены иммуноглобулинов человека, чтобы трансгенное животное продуцировало антитела человека. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к антителу против MAdCAM, которое не связывает комплемент.

[0149] В предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM представляет собой 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 или 150 (с сигнальной последовательностью или без нее) или переменную область, имеющую любую из указанных аминокислотных последовательностей, или одну или несколько CDR из этих аминокислотных последовательностей. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64 или 148 (с сигнальной последовательностью или без нее), или аминокислотную последовательность переменной области, или одну или несколько CDR из указанных аминокислотных последовательностей. Также изобретение относится к антителам человека против MAdCAM, содержащим аминокислотную последовательность от начала CDR1 до конца CDR3 любой из вышеупомянутых последовательностей. Кроме того, изобретение относится к антителу против MAdCAM, содержащему одну или несколько областей FR любой из вышеупомянутых последовательностей.

[0150] Кроме того, изобретение относится к антителу против MAdCAM, содержащему одну из вышеупомянутых аминокислотных последовательностей, в которую внесена одна или несколько модификаций. В некоторых вариантах осуществления остатки цистеина в антителе, которые могут быть химически реакционноспособными, заменены на другие остатки, такие как, но не ограничиваясь ими, аланин или серин. В одном варианте осуществления замена присутствует в неканоническом остатке цистеина. Замена может быть внесена в CDR или каркасную область переменного домена или в константный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина является каноническим.

[0151] В некоторых вариантах осуществления аминокислотную замену проводят для устранения потенциальных участков протеолиза в антителе. Такие участки могут

находиться в CDR или каркасной области вариабельного домена или в константном домене антитела. Замена остатков цистеина и удаление участков протеолиза может снизить гетерогенность в антительном продукте. В некоторых вариантах осуществления пары аспарагин-глицин, которые образуют потенциальные участки дезамидирования, устраняют путем изменения одного или обоих из остатков. В некоторых вариантах осуществления аминокислотную замену проводят для добавления или для удаления потенциальных участков гликозилирования в вариабельной области антитела по изобретению.

[0152] В некоторых вариантах осуществления С-концевой лизин тяжелой цепи антитела против MAdCAM по изобретению отщепляется. В различных вариантах осуществления изобретения тяжелая и легкая цепи антител против MAdCAM необязательно могут включать сигнальную последовательность.

[0153] В одном аспекте изобретение относится к двенадцати ингибиторным моноклональным антителам человека против MAdCAM и к гибридным клеточным линиям, которые продуцируют их. В таблице 1 приведены идентификаторы последовательностей (SEQ ID NO:) для нуклеиновых кислот, кодирующих полноразмерные тяжелые и легкие цепи (включая сигнальную последовательность), и соответствующие полноразмерные установленные аминокислотные последовательности.

Таблица 1

АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ MAdCAM				
Моноклональное Антитело	ИДЕНТИФИКАТОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ (SEQ ID NO:)			
	Полноразмерная			
	Тяжелая		легкая	
	ДНК	Белок	ДНК	Белок
1.7.2	1	2	3	4
1.8.2	5	6	7	8
6.14.2	9	10	11	12
6.22.2	13	14	15	16
6.34.2	17	18	19	20
6.67.1	21	22	23	24
6.73.2	25	26	27	28
6.77.1	29	30	31	32
7.16.6	33	34	35	36
7.20.5	37	38	39	40
7.26.4	41	42	43	44
9.8.2	45	46	47	48

X481.2	149	148	35	150
--------	-----	-----	----	-----

[0154] В другом аспекте изобретение относится к модифицированной версии определенных из идентифицированных выше моноклональных антител человека против MAdCAM. В таблице 2 приведены идентификаторы последовательностей для последовательностей ДНК и белка модифицированных антител.

Таблица 2

АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ MAdCAM				
Модифицированное моноклональное антитело	ИДЕНТИФИКАТОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ (SEQ ID NO:)			
	Полноразмерная			
	Тяжелая		Легкая	
	ДНК	Белок	ДНК	Белок
6.22.2-mod	51	52	53	54
6.34.2-mod	55	56	57	58
6.67.1-mod	59	60	61	62
6.77.1-mod	63	64	65	66
7.26.4-mod	41	42	67	68
X481.2	149	148	35	150

Класс и подкласс антител против MAdCAM

[0155] Антитело может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD. В предпочтительном варианте осуществления антитело относится к классу IgG и относится к подклассу IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄. В более предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM относится к подклассу IgG₂ или IgG₄. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM относится к тому же классу и подклассу, что и антитело 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod, который представляет собой IgG₂, или 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1 или 9.8.2, который представляет собой IgG₄.

[0156] Класс и подкласс антител против MAdCAM можно определять любым способом, известным в данной области. Как правило, класс и подкласс антитела можно определять с использованием антител, которые являются специфичными к конкретному классу и подклассу антител. Такие антитела являются коммерчески доступными. Класс и подкласс можно определять с использованием ELISA, вестерн-блоттинга, а также других способов. Альтернативно класс и подкласс можно определять посредством секвенирования всех или части константных доменов тяжелой и/или легкой цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов, и определения класса и подкласса антител в качестве класса,

демонстрирующего наиболее высокую идентичность последовательности.

Видовая и молекулярная селективность

[0157] В другом аспекте изобретение антитело против MAdCAM демонстрирует как видовую, так и молекулярную селективность. В одном варианте осуществления антитело против MAdCAM связывается с MAdCAM человека, яванского макака или собаки. В некоторых вариантах осуществления антитело против MAdCAM антитело не связывается с видом обезьян Нового Света, таким как мартышка. В соответствии с идеями, описанными в описании, видовую селективность для антитела против MAdCAM можно определять с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, видовую селективность можно определять с использованием вестерн-блоттинга, FACS, ELISA или иммуногистохимии. В предпочтительном варианте осуществления видовую селективность можно определять с использованием иммуногистохимии.

[0158] В некоторых вариантах осуществления антитело против MAdCAM, которое специфически связывает MAdCAM, обладает селективностью в отношении MAdCAM, превышающей по меньшей мере 10 раз, предпочтительно по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз, наиболее предпочтительно по меньшей мере 100 раз селективность в отношении VCAM, фибронектина или любого другого антигена. В предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM не демонстрирует какое-либо поддающееся определению связывание с VCAM, фибронектином или любым другим антигеном, отличным от MAdCAM. Селективность антитела против MAdCAM в отношении MAdCAM можно определять с использованием способов, хорошо известных в данной области, в соответствии с указаниями в настоящем описании. Например, селективность можно определять с использованием вестерн-блоттинга, FACS, ELISA или иммуногистохимии.

Аффинность связывания антител против MAdCAM с MAdCAM

[0159] В другом аспекте изобретения антитела против MAdCAM специфически связываются с MAdCAM с высокой аффинностью. В одном варианте осуществления антитело против MAdCAM специфически связывается с MAdCAM с K_d 3×10^{-8} М или менее при определении с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например BIAcore. В более предпочтительных вариантах осуществления антитело специфически связывается с MAdCAM с K_d 1×10^{-8} или менее или 1×10^{-9} М или менее. В еще более предпочтительном варианте осуществления антитело специфически связывается с MAdCAM с K_d 1×10^{-10} М или менее. В других предпочтительных вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с MAdCAM с K_d $2,66 \times 10^{-10}$ М или менее, $2,35 \times 10^{-11}$ М или менее, или 9×10^{-12} М или менее. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело специфически связывается с MAdCAM с K_d или 1×10^{-11} М или менее. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело специфически связывается с MAdCAM по существу с той же K_d , что и антитело, выбранное из 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6,

7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. Антитело "по существу с той же K_d ", что и у эталонного антитела, имеет K_d , которая на ± 100 пМ, предпочтительно ± 50 пМ, более предпочтительно ± 20 пМ, еще более предпочтительно ± 10 пМ, ± 5 пМ или ± 2 пМ отличается от K_d эталонного антитела в том же эксперименте. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело связывается с MAdCAM по существу с той же K_d , что и антитело, которое содержит один или несколько переменных доменов или одну или несколько CDR из антитела, выбранного из 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело связывается с MAdCAM по существу с той же K_d , что и у антитела, которое содержит одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66, 68, 148 или 450 (с сигнальной последовательностью или без нее), или их переменный домен. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело связывается с MAdCAM по существу с той же K_d , что и у антитела, которое содержит одну или несколько CDR из антитела, которое содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66, 68, 148 или 450.

[0160] Аффинность связывания антитела против MAdCAM с MAdCAM можно определять любым способом, известным в данной области. В одном варианте осуществления аффинность связывания можно определять посредством конкурентного ELISA, RIA или поверхностного плазмонного резонанса, например BIAcore. В более предпочтительном варианте осуществления аффинность связывания определяют посредством поверхностного плазмонного резонанса. В еще более предпочтительном варианте осуществления аффинность связывания и скорость диссоциации определяют с использованием BIAcore. Пример определения аффинности связывания описан ниже в примере II.

Время полужизни антител против MAdCAM

[0161] В соответствии с другой задачей изобретения антитело против MAdCAM имеет время полужизни по меньшей мере одни сутки *in vitro* или *in vivo*. В предпочтительном варианте осуществления антитело или его часть имеет время полужизни по меньшей мере трое суток. В более предпочтительном варианте осуществления антитело или его часть имеет время полужизни четверо суток или более. В другом варианте осуществления антитело или его часть имеет время полужизни восемь суток или более. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть являются дериватизированными или модифицированными так, чтобы они имели большее время полужизни, как рассмотрено ниже. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело может содержать точковые мутации для повышения времени полужизни в сыворотке, как описано в WO 00/09560, опубликованной 24 февраля 2000

года.

[0162] Время полужизни антитела можно определять любыми способами, известными специалисту в данной области. Например, время полужизни антитела можно определять с использованием вестерн-блоттинга, ELISA или RIA на протяжении надлежащего периода времени. Время полужизни антитела можно определять у любого подходящего животного, такого как примат, например, яванского макака или человека.

Идентификация эпитопов MAdCAM, распознаваемых антителом против MAdCAM

[0163] Также изобретение относится к антителу человека против MAdCAM, которое связывает тот же антиген или эпитоп, что и антитело человека против MAdCAM, описанное в настоящем описании. Кроме того, изобретение относится к антителу человека против MAdCAM, которое конкурирует или перекрестно конкурирует с антителом человека против MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления антитело человека против MAdCAM представляет собой 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело человека против MAdCAM содержит один или несколько переменных доменов или одну или несколько CDR из антитела, выбранного из 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело человека против MAdCAM содержит одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66, 68, 148 или 150 (с сигнальной последовательностью или без нее), или ее переменный домен. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело человека против MAdCAM содержит одну или несколько CDR из антитела, которое содержит одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66, 68, 148 или 150. В высокой степени предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM представляет собой другое антитело человека.

[0164] Определение того, связывается ли антитело против MAdCAM с тем же антигеном, что и другое антитело против MAdCAM, можно проводить с использованием различных способов, известных в данной области. Например, можно использовать известное антитело против MAdCAM для улавливания антигена, элюировать антиген от антитела против MAdCAM, а затем определять, связывается ли исследуемое антитело с элюированным антигеном. Определение того, конкурирует ли антитело с антителом против MAdCAM, можно проводить путем связывания антитела против MAdCAM с MAdCAM в насыщающих условиях, а затем определения способности исследуемого антитела связываться с MAdCAM. Если исследуемое антитело способно связываться с MAdCAM одновременно с антителом против MAdCAM, тогда исследуемое антитело

связывается с другим эпитопом, чем у антитела против MAdCAM. Однако, если исследуемое антитело не способно связываться с MAdCAM одновременно, то исследуемое антитело конкурирует с антителом человека против MAdCAM. Этот эксперимент можно проводить с использованием ELISA или поверхностного плазмонного резонанса, или предпочтительно BIAcore. Для исследования того, конкурирует ли антитело против MAdCAM перекрестно с другим антителом против MAdCAM, можно использовать конкурентный способ, описанный выше, в двух направлениях, т.е. путем определения того, блокирует ли известное антитело исследуемое антитело и наоборот.

Использование генов легкой и тяжелой цепей

[0165] Также изобретение относится к антителу против MAdCAM, которое содержит переменную область легкой цепи, кодируемую геном κ человека. В предпочтительном варианте осуществления переменная область легкой цепи кодируется семейством генов A2, A3, A26, B3, O12 или O18 $V\kappa$ человека. В различных вариантах осуществления легкая цепь содержит не более одиннадцати, не более шести или не более трех аминокислотных замен относительно последовательности A2, A3, A26, B3, O12 или O18 $V\kappa$ эмбрионального типа человека. В предпочтительном варианте осуществления аминокислотные замены представляют собой консервативные замены.

[0166] SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 и 150 представляют собой аминокислотные последовательности полноразмерных легких цепей каппа тринадцати антител против MAdCAM: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 и 9.8.2 и X481.2. На фиг.1K-1T представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных доменов легких цепей двенадцати антител против MAdCAM с последовательностями эмбрионального типа, из которых они происходят. На фиг.2A представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных доменов легких цепей каппа двенадцати антител против MAdCAM друг с другом. В соответствии с идеями, описанными в настоящем описании, специалист в данной области может определить различия между последовательностями эмбрионального типа и последовательностями дополнительных антител против MAdCAM. SEQ ID NO: 54, 58, 62, 66 или 68 представляют собой аминокислотные последовательности полноразмерных легких цепей каппа пяти дополнительных антител против MAdCAM: 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod, модифицированных путем внесения аминокислотной замены в их исходные антитела против MAdCAM: 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 или 7.26.4, соответственно.

[0167] В предпочтительном варианте осуществления VL антитела против MAdCAM содержит те же мутации относительно аминокислотной последовательности эмбрионального типа, что и любая одна или несколько из VL антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. Изобретение включает антитело против MAdCAM, в котором используются те же гены $V\kappa$ человека и $J\kappa$ человека, что и в

иллюстративном антителе. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или несколько из тех же мутаций относительно эмбрионального типа, что и одно или несколько проиллюстрированных антител. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит отличающиеся замены в одном или нескольких из тех же положений, что и в одном или нескольких проиллюстрированных антителах. Например, VL антитела против MAdCAM может содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые являются такими же, что и в антителе 7.16.6, и другую аминокислотную замену, которая является такой же, как и в антителе 7.26.4. Таким образом, можно смешивать и подбирать признаки связывания антител для изменения, например, аффинности антитела в отношении MAdCAM или его скорости диссоциации от антигена. В другом варианте осуществления мутации вносят в то же положение, что и в любой одной или нескольких из VL антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod, но вместо использования той же аминокислоты используют консервативные аминокислотные замены. Например, если аминокислотная замена по сравнению с эмбриональным типом в одном из антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod представляет собой глутамат, можно вносить консервативную замену на аспарат. Аналогично, если аминокислотная замена представляет собой серин, можно вносить консервативную замену на треонин.

[0168] В другом предпочтительном варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая является такой же, как и аминокислотная последовательность VL 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом в высокой степени предпочтительном варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотные последовательности, которые являются такими же, как и области CDR легкой цепи 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной областью CDR легкой цепи 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотные последовательности с CDR из различных легких цепей, в которых используются одни и те же гены V_κ и J_κ. В более предпочтительном варианте осуществления CDR из различных легких цепей получены из 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 64, 66, 68 или 150 с сигнальной последовательностью или без

нее. В другом варианте осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 или 67 (с сигнальной последовательностью или без нее), или нуклеотидной последовательностью, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую 1-11 вставок, делеций или замен аминокислот. Предпочтительно, аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В другом варианте осуществления антитело или его часть содержит легкую цепь лямбда.

[0169] Настоящее изобретение также относится к антителу против MAdCAM или его части, которые содержат последовательность гена VH человека или последовательность, происходящую из гена VH человека. В одном варианте осуществления тяжелая цепь аминокислотная последовательность происходит из семейства генов 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 или 4-4 VH человека. В различных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит не более пятнадцати, не более шести или не более трех изменений аминокислот относительно последовательностей гена 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 или 4-4 VH эмбрионального типа человека.

[0170] SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 и 148 представляют собой аминокислотные последовательности полноразмерных тяжелых цепей тринадцати антител против MAdCAM. На фиг.1A-1J приведено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелых цепей двенадцати антител против MAdCAM с последовательностями эмбрионального типа, из которых они происходят. На фиг.2B представлено выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелых цепей двенадцати антител против MAdCAM друг с другом. В соответствии с идеями, приведенными в настоящем описании, и нуклеотидными последовательностями по изобретению специалист в данной области может определить кодируемую аминокислотную последовательность двенадцати тяжелых цепей антитела против MAdCAM и тяжелых цепей эмбрионального типа и определить различие между последовательностями эмбрионального типа и последовательностями антитела. SEQ ID NO: 52, 56, 60 и 64 представляют собой аминокислотные последовательности полноразмерных тяжелых цепей антител против MAdCAM: 6.22.2-mod, 6.34.2-mod и 6.67.1-mod, модифицированных посредством аминокислотной замены относительно их исходных антител против MAdCAM: 6.22.2, 6.34.2 и 6.67.1, соответственно. Одно дополнительно модифицированное антитело против MAdCAM, 7.26.4-mod, имеет аминокислотную последовательность полноразмерной тяжелой цепи, которая представляет собой SEQ ID NO: 42.

[0171] В предпочтительном варианте осуществления VH антитела против MAdCAM содержит те же мутации относительно аминокислотной последовательности эмбрионального типа, что и одна или несколько из VH антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. Аналогично тому, что описано выше, антитело

содержит одну или несколько таких же мутаций относительно эмбрионального типа, что и одно или несколько иллюстративных антител. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит отличающиеся мутации в одном или нескольких из тех же положений, что и в одном или нескольких проиллюстрированных антител. Например, VH антитела против MAdCAM может содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые являются такими же, как и в антителе 7.16.6, и другую аминокислотную замену, которая является такой же, как и в антителе 7.26.4. Таким образом, можно смешивать и подбирать различные признаки связывания антитела для изменения, например, аффинности антитела в отношении MAdCAM или его скорости диссоциации от антигена. В другом варианте осуществления аминокислотную замену по сравнению с эмбриональным типом вносят в том же положении, что и замену относительно эмбрионального типа, как в любой одной или нескольких из VH эталонного антитела 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod, однако положение заменено другим остатком, которое представляет собой консервативную замену по сравнению с эталонным антителом.

[0172] В другом предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая является такой же, как и аминокислотная последовательность VH 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом в высокой степени предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотные последовательности, которые являются такими же, как и области CDR тяжелой цепи 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной области CDR тяжелой цепи 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.4, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотные последовательности с CDR из различных тяжелых цепей. В более предпочтительном варианте осуществления CDR из различных тяжелых цепей получены из 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64 или 148 с сигнальной последовательностью или без нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59, 63 или 149, или нуклеотидной последовательностью, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую 1-15 инсерций, делеций или замен аминокислот. В другом варианте осуществления замены представляют собой

консервативные аминокислотные замены.

Способы получения антител и продуцирующих антитела клеточных линий

Иммунизация

[0173] В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела человека продуцируют путем иммунизации не являющегося человеком животного, содержащего некоторые или все из локусов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека, антигеном MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления не являющимся человеком животным является животное XENOMOUSETM, которое представляет собой модифицированную способами инженерии линию мышей, которая содержит крупные фрагменты локусов иммуноглобулинов человека и имеет дефицит продукции антител мыши. См., например, Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994) и патенты США 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 и 6130364. Также см. WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 и WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 и WO 00/037504. Животное XENOMOUSETM продуцирует подобный взрослому репертуар полноразмерных антител человека и продуцирует антигенспецифические mAb человека. Животное XENOMOUSETM второго поколения содержит приблизительно 80% репертуара генов V антител человека путем введения фрагментов YAC, имеющих размер миллионы пар оснований, конфигурации эмбрионального типа локусов тяжелой цепи и легкой цепи к человека. В других вариантах осуществления мыши XENOMOUSETM содержат приблизительно все из локусов тяжелой цепи и легкой цепи λ человека. См. Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

[0174] Также изобретение относится к способу получения антител против MAdCAM из не являющегося человеком и не являющегося мышью животного путем иммунизации не являющихся человеком трансгенных животных, которые содержат локусы иммуноглобулинов человека. Таких животных можно получать с использованием способов, описанных непосредственно выше. Способы, описанные в этих документах, могут быть модифицированы, как описано в патенте США 5994619 ("патент '619"), который включен в настоящее описание в качестве ссылки. В патенте '619 описаны способы получения новых клеток или клеточных линий культивируемой внутренней клеточной массы (CICM), происходящих из свиней и коров, и трансгенных клеток CICM, в которую встроена гетерологичная ДНК. Трансгенные клетки CICM можно использовать для получения клонированных трансгенных эмбрионов, плодов и потомков. В патенте '619 также описаны способы получения трансгенных животных, которые способны передавать гетерологичную ДНК своему потомству. В предпочтительном варианте осуществления не являющиеся человеком животные могут представлять собой крыс, овец, свиней, коз, крупный рогатый скот или лошадей.

[0175] В другом варианте осуществления не являющиеся человеком животные, содержащие локусы иммуноглобулинов человека, представляют собой животных,

которые имеют "минилокус" иммуноглобулинов человека. В подходе минилокусов имитируют экзогенный локус Ig путем включения индивидуальных генов из локуса Ig. Таким образом, один или несколько генов VH, один или несколько генов DH, один или несколько генов JH, константный домен(ы) μ , и второй константный домен(ы) (предпочтительно константный домен(ы) гамма) образуют конструкцию для встраивания у животного. Этот подход описан, среди прочего, в патенте США № 5545807, 5545806, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650, 5814318, 5591669, 5612205, 5721367, 5789215 и 5643763, включенном в настоящее описание в качестве ссылки.

[0176] Преимуществом подхода минилокусов является быстрота, с которой можно получать конструкции, включающие части локуса Ig, и вводить животным. Однако потенциальный недостаток подхода минилокусов состоит в том, что может не быть достаточного разнообразия иммуноглобулинов для поддержания полного развития В-клеток, так что продукция антител может быть более низкой.

[0177] Для получения антитела человека против MAdCAM не являющееся человеком животное, содержащее некоторые или все из локусов иммуноглобулинов человека, иммунизируют антигеном MAdCAM и антитело или продуцирующую антитело клетку извлекают из животного. Антиген MAdCAM может представлять собой выделенный и/или очищенный MAdCAM, и предпочтительно он представляет собой MAdCAM человека. В другом варианте осуществления антиген MAdCAM представляет собой фрагмент MAdCAM, предпочтительно внеклеточный домен MAdCAM. В другом варианте осуществления антиген MAdCAM представляет собой фрагмент, который содержит по меньшей мере один эпитоп MAdCAM. В другом варианте осуществления антиген MAdCAM представляет собой клетку, которая экспрессирует MAdCAM на ее клеточной поверхности, предпочтительно клетку, которая сверхэкспрессирует MAdCAM на ее клеточной поверхности.

[0178] Иммунизацию животных можно проводить любым способом, известным в данной области. См., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press (1990). Способы иммунизации не являющихся человеком животных, таких как мыши, крысы, овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот и лошади, хорошо известны в данной области. См., например, Harlow and Lane и патент США 5994619. В предпочтительном варианте осуществления антиген MAdCAM вводят с адъювантом для стимуляции иммунного ответа. Такие адъюванты включают полный или неполный адъювант Фрейнда, RIBI (мурамилдипептиды) или ISCOM (иммуностимулирующие комплексы). Такие адъюванты могут защищать полипептид от быстрого рассеивания путем изоляции его в локальном депо, или они могут содержать вещества, которые стимулируют хозяина к секреции факторов, которые являются хемотаксическими для макрофагов макрофаги и других компонентов иммунной системы. Предпочтительно, если вводят полипептид, схема иммунизации вовлекает два или несколько введений на протяжении нескольких недель.

[0179] В примере I описан протокол иммунизации животного XENOMOUSETM

полноразмерным MAdCAM человека в фосфатно-солевом буфере.

Получение антител и продуцирующих антитела клеточных линий

[0180] После иммунизации животного антигеном MAdCAM из животного можно получать антитела и/или продуцирующие антитела клетки. Сыворотку, содержащую антитело против MAdCAM, получают из животного путем кровопускания или умерщвления животного. Сыворотку можно использовать в том виде, в котором ее получают от животного, из сыворотки можно получать фракцию иммуноглобулинов или из сыворотки можно очищать антитела против MAdCAM.

[0181] В другом варианте осуществления из иммунизированного животного можно получать продуцирующие антитела иммортализованные клеточные линии. После иммунизации животное умерщвляют и В-клетки иммортализируют с использованием способов, хорошо известных в данной области. Способы иммортализации клеток включают, но не ограничиваются ими, трансфекцию их онкогенами, инфицирование их онкогенным вирусом и культивирование их в условиях, которые обеспечивают селекцию иммортализованных клеток, воздействие на них канцерогенных или мутагенных соединений, слияние их с иммортализованной, например, миеломной клеткой, и инактивацию гена-супрессора опухоли. См., например, Harlow and Lane, выше. В вариантах осуществления, вовлекающих миеломные клетки, миеломные клетки не секретируют полипептиды иммуноглобулинов (несекреторная клеточная линия). После иммортализации и селекции с антибиотиком иммортализованные клетки или их культуральные супернатанты подвергают скринингу с использованием MAdCAM, его части или клетки, экспрессирующей MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления первоначальный скрининг проводят с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или радиоиммунного анализа (RIA), предпочтительно ELISA. Пример скрининга с использованием ELISA приведен в публикации PCT № WO 00/37504, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

[0182] В другом варианте осуществления продуцирующие антитела клетки можно получать от человека, который имеет аутоиммунное нарушение и у которого экспрессируются антитела против MAdCAM. Клетки, экспрессирующие антитела против MAdCAM, можно выделять путем выделения лейкоцитов и проведения флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) или пэннинга на планшетах, покрытых MAdCAM или его частью. Эти клетки могут быть слиты с несекреторными миеломными клетками человека с получением гибридом человека, экспрессирующих антитела человека против MAdCAM. Как правило, это является менее предпочтительным вариантом осуществления, поскольку вероятно, что антитела против MAdCAM будут иметь низкую аффинность в отношении MAdCAM.

[0183] Клетки, продуцирующие антитело против MAdCAM, например, гибридомы подвергают селекции, клонированию и дальнейшему скринингу в отношении желаемых характеристик, включая устойчивый рост клеток, высокую продукцию антител и желаемые характеристики антител, как дополнительно описано ниже. Гибридомы можно

культивировать и увеличивать в количестве *in vivo* у сингенных животных, у животных, которые лишены иммунной системы, например, мышей nude или в клеточной культуре *in vitro*. Способы селекции, клонирования и увеличения в количестве гибридом хорошо известны средним специалистам в данной области.

[0184] Предпочтительно, иммунизированное животное представляет собой не являющееся человеком животное, которое экспрессирует гены иммуноглобулинов человека, и В-клетки селезенки подвергают слиянию с миеломой, происходящей из того же вида, что и не являющееся человеком животное. Более предпочтительно, иммунизированное животное представляет собой животное XENOMOUSE™ и миеломная клеточная линия представляет собой несекреторную миелому мыши, такую как миеломная клеточная линия P3-X63-AG8-653 (ATCC). См., например, пример I.

[0185] Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к способам получения клеточной линии, которая продуцирует моноклональное антитело человека или его фрагмент, направленные на MAdCAM, включающим (a) иммунизацию не являющегося человеком трансгенного животного, описанного в настоящем описании, посредством MAdCAM, части MAdCAM, или клетки или ткани, экспрессирующей MAdCAM; (b) позволение трансгенному животному индуцировать иммунный ответ на MAdCAM; (c) получение продуцирующих антитела клеток из трансгенного животного; (d) иммортализацию продуцирующих антитела клеток; (e) создание индивидуальных моноклональных популяций иммортализованных продуцирующих антитела клеток; и (f) скрининг иммортализованных продуцирующих антитела клеток или их культуральных супернатантов для идентификации антитела, направленного на MAdCAM.

[0186] В одном аспекте изобретение относится к гибриdomам, которые продуцируют антитела человека против MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления гибриdomы представляют собой гибриdomы мыши, как описано выше. В другом варианте осуществления гибриdomы продуцируются в не являющемся человеком и не являющемся мышью виде, таком как крысы, овцы, свиньи, козы, крупный рогатый скот или лошади. В другом варианте осуществления гибриdomы представляют собой гибриdomы человека, в которых несекреторная миелома человека слита с клеткой человека, экспрессирующей антитело против MAdCAM.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы получения антител

Нуклеиновые кислоты

[0187] Предусматриваются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела против MAdCAM. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую и/или легкую цепь иммуноглобулина против MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления она молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина против MAdCAM, а другая молекула нуклеиновой кислоты кодирует легкую цепь иммуноглобулина против MAdCAM. В более предпочтительном варианте осуществления кодируемый иммуноглобулин представляет

собой иммуноглобулин человека, предпочтительно IgG человека. Кодированная легкая цепь может представлять собой цепь λ или цепь κ , предпочтительно цепь κ .

[0188] В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариативную область легкой цепи, содержит последовательность эмбрионального типа гена A2, A3, A26, B3, O12 или O18 V κ человека или вариант указанной последовательности. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь, содержит последовательность, происходящую из гена J κ 1, J κ 2, J κ 3, J κ 4 или J κ 5 человека. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь, кодирует не более одиннадцати изменений аминокислот относительно гена A2, A3, A26, B3, O12 или O18 V κ эмбрионального типа, предпочтительно не более шести изменений аминокислот и еще более предпочтительно не более трех изменений аминокислот. В более предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь, представляет собой последовательность эмбрионального типа.

[0189] Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариативную область легкой цепи (VL), содержащую вплоть до одиннадцати изменений аминокислотных по сравнению с последовательностью эмбрионального типа, где изменения аминокислот идентичны аминокислотным заменам относительно последовательности эмбрионального типа VL одного из антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. Также изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность вариативной области легкой цепи 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. Также изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность одной или нескольких CDR любой из легких цепей 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность всех CDR любой из легких цепей 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68, 150 или содержит нуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 или 67. В другом предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность одной или

нескольких CDR любой из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68, 150, или содержит нуклеотидную последовательность одной или нескольких CDR любой из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 или 67. В более предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность всех CDR любой из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68, 150 или содержит нуклеотидную последовательность всех CDR любой из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 или 67.

[0190] Также изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность VL, которая обладает аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична VL, описанной выше, в частности, VL, которая содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 или 150. Также изобретение относится к нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности одной из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 или 67.

[0191] В другом варианте осуществления изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей VL, как описано выше, в частности, молекулой нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68, 150. Также изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 или 67.

[0192] Также изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей переменную область тяжелой цепи (VH), в которой используется ген 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 или 4-4 VH человека. В некоторых вариантах осуществления в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей ген VH, дополнительно используется ген семейства JH4 или JH6 человека. В некоторых вариантах осуществления в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей ген VH, используется ген JH4b или JH6b человека. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, происходящую из гена 3-10, 4-23, 5-5, 6-6 или 6-19 D человека. В еще более предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VH, содержит не более пятнадцати изменений аминокислот относительно генов 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 или 4-4 VH эмбрионального типа, предпочтительно не более шести изменений аминокислот и еще более предпочтительно не более трех изменений аминокислот. В высокой степени предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VH, содержит по меньшей мере одно

изменение аминокислоты по сравнению с последовательностью эмбрионального типа, где изменение аминокислоты идентично изменению аминокислоты относительно последовательности эмбрионального типа в тяжелой цепи одного из антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В еще более предпочтительном варианте осуществления VH содержит не более пятнадцати изменений аминокислот по сравнению с последовательностями эмбрионального типа, где изменения идентичны изменениям относительно последовательности эмбрионального типа в VH одного из антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod.

[0193] В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность VH 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность одной или нескольких CDR тяжелой цепи 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности, которые кодируют аминокислотные последовательности всех CDR тяжелой цепи 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64 или 148 или которая содержит нуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59, 63 или 149. В другом предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность одной или нескольких CDR любой из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64 или 148 или содержит нуклеотидную последовательность одной или нескольких CDR любой из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59, 63 или 149. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотные последовательности всех CDR любой из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64, 148 или содержит нуклеотидную последовательность всех CDR любой из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59, 63 или 149. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую непрерывную область от начала CDR1 до конца CDR3

тяжелой или легкой цепи любого из вышеупомянутых антител против MAdCAM.

[0194] В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VH, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична одной из аминокислотных последовательностей, кодирующих VH, как описано непосредственно выше, в частности, VH, которая содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 или 64. Также изобретение относится к нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности одной из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59, 63 или 149.

[0195] В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VH, представляет собой молекулу нуклеиновой кислот, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью, кодирующей VH, как описано выше, в частности, VH, которая содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64 или 148. Также изобретение относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей VH, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей одну из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59, 63, 149.

[0196] Нуклеотидная последовательность, кодирующую любую или обе из целой тяжелой и легкой цепей антитела против MAdCAM или его переменные области, можно получать из любого источника, который продуцирует антитело против MAdCAM. Способы выделения мРНК, кодирующей антитело, хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). мРНК можно использовать для получения кДНК для применения в полимеразной цепной реакции (ПЦР) или клонировании кДНК генов антител. В одном варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот можно получать из гибридомы, которая экспрессирует антитело против MAdCAM, как описано выше, предпочтительно гибридомы, которая имеет в качестве одного из ее партнеров по слиянию трансгенную клетку животного, которая экспрессирует гены иммуноглобулинов человека, такого как животное XENOMOUSETM, не являющееся человеком трансгенное животное, или не являющееся человеком и не являющееся мышью трансгенное животное. В другом варианте осуществления гибридома происходит из не являющегося человеком нетрансгенного животного, которое можно использовать, например, для гуманизированных антител.

[0197] Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую всю тяжелую цепь антитела против MAdCAM, можно конструировать путем слияния молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей весь переменный домен тяжелой цепи или его антигенсвязывающий домен, с константным доменом тяжелой цепи. Аналогично, молекулу нуклеиновой кислоты,

кодирующую легкую цепь антитела против MAdCAM, можно конструировать путем слияния молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный домен легкой цепи или его антигенсвязывающий домен, с константным доменом легкой цепи. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие области VH и VL, можно конвертировать в полноразмерные гены антител путем встраивания их в экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжелой и легкой цепей, соответственно, так чтобы сегмент VH был функционально связан с сегментом(ами) константной области тяжелой цепи (CH) в векторе и сегмент VL был функционально связан с сегментом константной области легкой цепи (CL) в векторе. Альтернативно молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие цепи VH или VL, конвертируют в полноразмерные гены антител путем связывания, например лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь VH, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь CH, с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Того же можно достигать с использованием молекул нуклеиновых кислот, кодирующих цепи VL и CL. Последовательности генов константных областей тяжелой и легкой цепи известны в данной области. См., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., NIH Publ. № 91-3242 (1991). Затем можно обеспечивать экспрессию молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, из клетки, в которую они были введены, и выделять антитело против MAdCAM.

[0198] В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи, кодирует переменную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60, 64 или 148, и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область легкой цепи, кодирует переменную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 или 150.

[0199] В одном варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую либо тяжелую цепь антитела против MAdCAM или ее антигенсвязывающую часть, либо легкую цепь антитела против MAdCAM или ее антигенсвязывающую часть, можно выделять из не являющегося человеком и не являющегося мышью животного, у которого экспрессируются гены иммуноглобулинов человека и которое было иммунизировано антигеном MAdCAM. В другом варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты можно выделять из клетки, продуцирующей антитело против MAdCAM, происходящей из нетрансгенного животного или из пациента-человека, у которого продуцируются антитела против MAdCAM. мРНК из клеток, продуцирующих антитело против MAdCAM, можно выделять стандартными способами, клонировать и/или амплифицировать с использованием ПЦР и способов конструирования библиотек, и подвергать скринингу с использованием стандартных протоколов для получения молекул нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антитела против MAdCAM.

[0200] Молекулы нуклеиновых кислот можно использовать для рекомбинантной

экспрессии больших количеств антител против MAdCAM, как описано ниже. Молекулы нуклеиновых кислот также можно использовать для получения химерных антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, диантител, мутантных антител и производных антител, как дополнительно описано ниже. Если молекулы нуклеиновых кислот происходят из не являющегося человеком нетрансгенного животного, молекулы нуклеиновых кислот можно использовать для гуманизации антител, как также описано ниже.

[0201] В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот по изобретению можно использовать в качестве зондов или праймеров ПЦР для конкретных последовательностей антител. Например, зонд в виде молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать в диагностических способах, или праймер ПЦР в виде молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать для амплификации областей ДНК, которые можно использовать, среди прочего, для выделения нуклеотидных последовательностей для применения для продуцирования вариабельных доменов антител против MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот представляют собой олигонуклеотиды. В более предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотиды происходят из в высокой степени вариабельных областей тяжелой и легкой цепей представляющего интерес антитела. В еще более предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотиды кодируют всю или часть одной или нескольких CDR.

Векторы

[0202] Изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот по изобретению, которые кодируют тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть. Также изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот по изобретению, которые кодируют легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть. Также изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды.

[0203] Для экспрессии антител или частей антител по изобретению ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученные как описано выше, встраивают в экспрессирующие векторы, так чтобы гены были функционально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. Экспрессирующие векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, космиды, YAC, происходящие из EBV эписомы и т.п. Ген антитела лигируют вектор, так чтобы последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторы выполняли их предполагаемую функцию регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессирующий вектор и последовательности контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимыми с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно

встраивать в отдельные векторы. В предпочтительном варианте осуществления оба гена встраивают в один и тот же экспрессирующий вектор. Гены антител встраивают в экспрессирующий вектор стандартными способами (например, лигирование комплементарных участков рестрикции на фрагменте гена антитела и векторе, или лигирование тупых концов, если участки рестрикции отсутствуют).

[0204] Удобным вектором является вектор, который кодирует функционально полную последовательность СН или СL иммуноглобулина с надлежащими участками рестрикции, встроенными так, чтобы любую последовательность V_H или V_L можно было без труда встроить и экспрессировать, как описано выше. В таких векторах сплайсинг обычно происходит между донорным участком сплайсинга во встраиваемой J-области и акцепторным участком сплайсинга, предшествующим C-области человека, а также в областях сплайсинга, которые встречаются в экзонах СН человека. Полиаденилирование и терминация транскрипции происходят в нативных областях хромосомы ниже кодирующих областей. Рекомбинантный экспрессирующий вектор также может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор, так чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с N-концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

[0205] В дополнение к генам цепей антител рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению содержат регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антител в клетке-хозяине. Специалистам в данной области будет понятно, что конструкция экспрессирующих векторов, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желаемый уровень экспрессии белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего включают вирусные элементы, которые определяют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из ретровирусных LTR, цитомегаловируса (CMV) (такие как промотор/энхансер CMV), вируса 40 обезьян (SV40) (такие как промотор/энхансер SV40), аденовирус (например, большой поздний промотор аденовируса (AdMLP)), промоторы полиомы и сильные промоторы млекопитающих, такие как нативные промоторы иммуноглобулинов и актина. Для дальнейшего описания вирусных регуляторных элементов и их последовательностей см., например, патенты США № 5168062, 4510245 и 4968615, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Способы экспрессии антител в растениях, включая описание промоторов и векторов, а также трансформации растений, известны в данной области. См., например, патент США 6517529. Способы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, клетках дрожжей, также хорошо известны в данной области.

[0206] В дополнение к генам цепей антител и регуляторным последовательностям рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут содержать дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, ориджины репликации), и гены селективных маркеров. Ген селективного маркера способствует селекции клеток-хозяев, в которых он трансформирован (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017). Например, как правило, ген селективного маркера сообщает резистентность к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, на клетке-хозяине, в которую введен вектор. Предпочтительные гены селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в клетках-хозяевах dhfr^r с селекцией/амплификацией с метотрексатом) и ген нео (для селекции с G418) и ген глутаматсинтазы.

Не являющиеся гибридными клетки-хозяева и способы рекомбинантного продуцирования белка

[0207] Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть и/или легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела против MAdCAM, и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновых кислот, можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего, растения, бактерий или дрожжей. Трансформацию можно проводить любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредуемую декстраном трансфекцию, преципитацию с фосфатом кальция, опосредуемую полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот можно вводить в клетки-млекопитающих с использованием вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США № 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455 (которые включены в настоящее описание в качестве ссылок). Способы трансформации клеток растений хорошо известны в данной области, включая, например, опосредуемую *Agrobacterium* трансформацию, биолистическую трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Способы трансформации бактериальных и дрожжевых клеток также хорошо известны в данной области.

[0208] Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают многие иммортализованные клеточные линии, доступные от American Type Culture Collection (ATCC). Они включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NS0, клетки SP2, клетки HEK-293T, клетки NIH-3T3, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночно-клеточной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и ряд других клеточных линий. Клетки-хозяева

млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомячка. Особенно предпочтительные клеточные линии выбирают путем определения того, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии. Другими клеточными линиями, которые можно использовать, являются клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9, клетки земноводных, бактериальные клетки, клетки растений и клетки грибов. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие тяжелую цепь или их антигенсвязывающую часть, легкую цепь и/или ее антигенсвязывающую часть, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секрети антитела в культуральную среду, в которой клетки-хозяева выращивают. Антитела можно выделять из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белка. Клетки-хозяева растений включают, например, клетки *Nicotiana*, *Arabidopsis*, яски, кукурузы, пшеницы, картофеля и т.д. Бактериальные клетки-хозяева включают *E. coli* и виды *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

[0209] Кроме того, экспрессия антител по изобретению (или их других частей) из продуцирующих клеточных линий может быть усилена с использованием ряда известных способов. Например, экспрессирующая система гена глутаминсинтетазы (система GS) является распространенным подходом для повышения экспрессии в определенных условиях. Система GS обсуждается полностью или частично в патентах Европы № 0 216 846, 0 256 055, 0 338 841 и 0 323 997.

[0210] Вероятно, что антитела, экспрессируемые различными клеточными линиями или трансгенными животными, будут иметь различающееся гликозилирование. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот, описанными в настоящем описании, или содержащие аминокислотные последовательности, описанные в настоящем описании, являются частью настоящего изобретения, независимо от гликозилирования антител.

Трансгенные животные и растения

[0211] Также изобретение относится к трансгенным не являющимся человеком животным и трансгенным растениям, содержащим одну или несколько молекул нуклеиновых кислот по изобретению, которые можно использовать для продуцирования антител по изобретению. Антитела можно продуцировать и выделять из тканей или жидкостей организма, таких как молоко, кровь или моча, коз, коров, лошадей, свиней, крыс, мышей, кроликов, хомячков или других млекопитающих. См., например, патенты США № 5827690, 5756687, 5750172 и 5741957. Как описано выше, не являющихся человеком трансгенных животных, которые содержат локусы иммуноглобулинов человека, можно иммунизировать MAdCAM или его частью. Способы получения антител в растениях описаны, например, в патентах США 6046037 и 5959177, включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

[0212] В другом варианте осуществления не являющихся человеком трансгенных животных и трансгенные растения получают путем введения одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты животному или в растение стандартными способами введения трансгенов. См. Hogan, *выше*. Трансгенные клетки, используемые для получения трансгенного животного, могут представлять собой эмбриональные стволовые клетки, соматические клетки или оплодотворенные яйцеклетки. Трансгенные не являющиеся человеком организмы могут представлять собой химеры, нехимерные гетерозиготы и нехимерные гомозиготы. См., например, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); и Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). В другом варианте осуществления трансгенные не являющиеся человеком организмы могут иметь направленное разрушение и замену, которая кодирует представляющую интерес тяжелую цепь и/или легкую цепь. В предпочтительном варианте осуществления трансгенные животные или растения содержат и экспрессируют молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелые и легкие цепи, объединенные для специфического связывания с MAdCAM, предпочтительно MAdCAM человека. В другом варианте осуществления трансгенные животные или растения содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие модифицированное антитело, такое как одноцепочечное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело. Антитела против MAdCAM можно получать в любом трансгенном животном. В предпочтительном варианте осуществления не являющиеся человеком животные представляют собой мышей, крыс, овец, свиней, коз, крупный рогатый скот или лошадей. Указанные кодируемые полипептиды экспрессируются у не являющегося человеком трансгенного животного в крови, молоке, моче, слюне, слезной жидкости, слизи и других жидкостях организма.

Библиотеки фагового дисплея

[0213] Изобретение относится к способу получения антитела против MAdCAM или его антигенсвязывающей части, включающему стадии синтеза библиотеки антител человека на фаге, скрининг библиотеки с использованием MAdCAM или его части, выделение фага, который связывает MAdCAM, и получение антитела из фага. Один способ получения библиотеки антител включает стадии иммунизации не являющегося человеком животного-хозяина, содержащего locus иммуноглобулина человека, посредством MAdCAM или его антигенной части для достижения иммунного ответа, извлечение из животного-хозяина клеток, которые ответственны за продуцирование антител; выделение РНК из экстрагированных клеток, обратную транскрипцию РНК для получения кДНК, амплификацию кДНК с использованием праймера и встраивание кДНК в вектор фагового дисплея, так чтобы на фаге экспрессировались антитела. Таким образом можно получать рекомбинантные антитела против MAdCAM по изобретению.

[0214] Рекомбинантные антитела против MAdCAM человека по изобретению в дополнение к антителам против MAdCAM, описанным в настоящем описании, можно

выделять посредством скрининга рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, предпочтительно библиотеки фагового дисплея scFv, полученной с использованием кДНК VL и VH человека, полученной из мРНК, выделенной из лимфоцитов человека. Методологии получения и скрининга таких библиотек известны в данной области. Существуют коммерчески доступные наборы для получения библиотек фагового дисплея (например, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, каталожный номер № 27-9400-01; и набор для фагового дисплея Stratagene SurfZAPTM, каталожный номер № 240612). Также существуют другие способы и реагенты, которые можно использовать для получения и скрининга библиотек фагового дисплея (см., например, патент США № 5223409; публикацию PCT № WO 92/18619; публикацию PCT № WO 91/17271; публикацию PCT № WO 92/20791; публикацию PCT № WO 92/15679; публикацию PCT № WO 93/01288; публикацию PCT № WO 92/01047; публикацию PCT № WO 92/09690; Fuchs et al. (1991), *Biotechnology*, 9:1369-1372; Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J*, 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Biotechnology*, 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc Acid Res*, 19:4133-4137 (1991); и Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991).

[0215] В предпочтительном варианте осуществления для выделения антител против MAdCAM с желаемыми характеристиками сначала используют антитело человека против MAdCAM, как описано в настоящем описании, для селекции последовательностей тяжелых и легких цепей человека, имеющих сходную активность связывания с MAdCAM, с использованием способов импринтинга эпитопов, описанных в Hoogenboom et al., публикация PCT № WO 93/06213. Библиотеки антител, используемые в этом способе, предпочтительно представляют собой библиотеки scFv, получаемые и подвергаемые скринингу, как описано в McCafferty et al., публикация PCT № WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); и Griffiths et al., *EMBO J*, 12:725-734 (1993). Библиотеки антител scFv предпочтительно подвергают скринингу с использованием MAdCAM человека в качестве антигена.

[0216] После селекции первоначальных сегментов VL и VH, проводят эксперименты по "смешению и подбору", в которых различные пары первоначально отобранных сегментов VL и VH подвергают скринингу в отношении связывания MAdCAM, для селекции предпочтительных комбинаций пар VL/VH. Кроме того, для дальнейшего повышения качества антитела в сегменты VL и VH предпочтительной пары(пар) VL/VH можно вносить случайные мутации, предпочтительно в области CDR3 VH и/или VL, в способе, аналогичном способу внесения соматических мутаций *in vivo*, ответственных за созревание аффинности антител в ходе природного иммунного ответа. Это созревание аффинности *in vitro* можно проводить посредством амплификации областей VH и VL с использованием праймеров ПЦР, комплементарных CDR3 VH или

CDR3 VL, соответственно, к которых добавлена случайная смесь четырех нуклеотидных оснований в определенных положениях, так что полученные продукты ПЦР кодируют сегменты VH и VL, в которых в области CDR3 VH и/или VL внесены случайные мутации. Эти сегменты VH и VL со случайными мутациями можно вновь подвергать скринингу в отношении связывания с MAdCAM.

[0217] После скрининга и выделения антитела против MAdCAM по изобретению из библиотеки дисплея рекомбинантных иммуноглобулинов из упаковки дисплея (например, из генома фага) можно выделять нуклеиновую кислоту, кодирующую выделенное антитело и субклонировать в другие экспрессирующие векторы стандартными способами рекомбинантных ДНК. Если желательно, можно проводить дальнейшее манипулирование нуклеиновой кислотой для получения других форм антитела по изобретению, как описано ниже. Для экспрессии рекомбинантного антитела человека, выделенного посредством скрининга комбинаторной библиотеки, ДНК, кодирующую антитело, клонируют в рекомбинантный экспрессирующий вектор и вводят в клетки-хозяева млекопитающих, как описано выше.

Переключение классов

[0218] Другой аспект настоящего изобретения относится к предоставлению механизма, посредством которого класс антитела против MAdCAM может быть переключен на другой класс. В одном аспекте изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с использованием способов, хорошо известных в данной области, так что она не включает никаких нуклеотидных последовательностей, кодирующих CL или CH. Затем молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, функционально связывают с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CL или CH, из другого класса молекулы иммуноглобулина. Это можно осуществлять с использованием вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат последовательность, кодирующую CL или CH, как описано выше. Например, класс антитела против MAdCAM, которое первоначально является IgM, можно переключать на IgG. Кроме того, переключение классов можно использовать для конвертирования одного подкласса IgG в другой, например, из IgG4 в IgG2. Предпочтительный способ продуцирования антитела по изобретению, содержащего желаемый изотип или подкласс антител, включает стадии выделения нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против MAdCAM, и нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против MAdCAM, получения вариабельной области тяжелой цепи, лигирования вариабельной области тяжелой цепи с константным доменом тяжелой цепи требуемого изотипа, экспрессии легкой цепи и лигированной тяжелой цепи с константным доменом тяжелой цепи желаемого изотипа, экспрессии легкой цепи и лигированной тяжелой цепи в клетке и сбора антитела против MAdCAM желаемого изотипа.

Производные антител

[0219] Молекулы нуклеиновых кислот, описанные выше, можно использовать для

получения производных антител с использованием методологий и способов, известных специалисту в данной области.

Гуманизированные антитела

[0220] Иммуногенность не являющихся человеческими антител можно уменьшать до некоторой степени с использованием способов гуманизации с возможным использованием способов дисплея с помощью надлежащих библиотек. Будет понятно, что антитела мыши или антитела другого вида можно гуманизировать или приматизировать способами, хорошо известными в данной области. См., например, Winter and Harris, *Immunol Today*, 14:43-46 (1993) и Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.*, 12:125- 168 (1992). Представляющее интерес антитело можно конструировать способами рекомбинантных ДНК для замены CH1, CH2, CH3, шарнирных доменов и/или каркасного домена соответствующей последовательностью человека (см. WO 92/02190 и патенты США № 5530101, 5585089, 5693761, 5693792, 5714350 и 5777085). В другом варианте осуществления не являющееся человеческим антитело против MAdCAM можно гуманизировать путем замены CH1, шарнирного домена, CH2, CH3 и/или каркасных доменов соответствующей последовательностью человека из антитела против MAdCAM по изобретению.

Мутантные антитела

[0221] В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот, векторы и клетки-хозяева можно использовать для получения мутантных антител против MAdCAM. Мутации в антителах могут быть внесены в вариабельные домены тяжелой и/или легкой цепей для изменения свойства связывания антитела. Например, мутация может быть внесена в одну или несколько областей CDR для увеличения или уменьшения Kd антитела в отношении MAdCAM. Способы сайт-направленного мутагенеза хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., и Ausubel et al., *выше*. В предпочтительном варианте осуществления мутации вносят в аминокислотный остаток, о котором известно, что он изменен по сравнению с последовательностью эмбрионального типа в вариабельной области антитела против MAdCAM. В более предпочтительном варианте осуществления одну или несколько мутаций вносят в аминокислотный остаток, о котором известно, что он изменен по сравнению с последовательностью эмбрионального типа в вариабельной области или области CDR одного из антител против MAdCAM 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом варианте осуществления одну или несколько мутаций вносят в аминокислотный остаток, о котором известно, что он изменен по сравнению с последовательностью эмбрионального типа в вариабельной области или области CDR, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66, 68 148 или 150 или нуклеотидная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 или 149. В другом

варианте осуществления в молекулы нуклеиновых кислот вносят мутации в одной или нескольких каркасных областях. Мутацию можно вносить в каркасную область или константный домен для увеличения времени полужизни антитела против MAdCAM. См., например, WO 00/09560, опубликованную 24 февраля 2000 года, включенную в настоящее описание в качестве ссылки. В одном варианте осуществления может быть одна, три, или пять, или десять точковых мутаций и не более пятнадцати точковых мутаций. Мутацию в каркасной области или константном домене также можно вносить для изменения иммуногенности антитела, для предоставления участка для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой или для изменения таких свойств, как фиксация комплемента. Мутации можно вносить в каждую из каркасных областей, константного домена и переменных областей одного мутантного антитела. Альтернативно мутации можно вносить только в одно из каркасных областей, переменных областей или константного домена одного мутантного антитела.

[0222] В одном варианте осуществления как в области VH, так и в области VL мутантного антитела против MAdCAM присутствует не более пятнадцати изменений аминокислот по сравнению с антителом против MAdCAM перед внесением мутации. В более предпочтительном варианте осуществления как в области VH, так и в области VL мутантного антитела против MAdCAM присутствует не более десяти изменений аминокислот, более предпочтительно не более пяти изменений аминокислот или еще более предпочтительно не более трех изменений аминокислот. В другом варианте осуществления в константных доменах присутствует не более пятнадцати изменений аминокислот, не более десяти изменений аминокислот, еще более предпочтительно не более пяти изменений аминокислот.

Модифицированные антитела

[0223] В другом варианте осуществления можно получать слитое антитело или иммуноадгезин, которые содержат все или часть антитела против MAdCAM, связанные с другим полипептидом. В предпочтительном варианте осуществления только переменные области антитела против MAdCAM связаны с полипептидом. В другом предпочтительном варианте осуществления VH-домен антитела против MAdCAM связан с первым полипептидом, в то время как VL-домен антитела против MAdCAM связан со вторым полипептидом, который ассоциирован с первым пептидом таким образом, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом с образованием связывающего участка антитела. В другом предпочтительном варианте осуществления VH-домен отделен от VL-домена линкером, так что VH- и VL-домены могут взаимодействовать друг с другом (см. ниже описание одноцепочечных антител). Затем VH-линкер-VL связывают с представляющим интерес полипептидом. Слитое антитело является пригодным для направления полипептида в экспрессирующую MAdCAM клетку или ткань. Полипептид может представлять собой терапевтическое средство, такое как токсин, фактор роста или другой регуляторный белок, или может представлять собой диагностическое средство, такое как фермент, которое можно без труда визуализировать, такой как пероксидаза

хрена. Кроме того, можно получать слитые антитела, в которых два (или более) одноцепочечных антител связаны друг с другом. Это является пригодным, если желательно создать двухвалентное или поливалентное антитело на одной полипептидной цепи, или если желательно создать биспецифическое антитело.

[0224] Для создания одноцепочечного антитела (scFv) фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃, так что последовательности VH и VL могут экспрессироваться в качестве непрерывного одноцепочечного белка с областями VL и VH, связанными гибким линкером (см., например, Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)). Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если используют только одну VH и VL, двухвалентной, если используют две VH и VL, или поливалентным, если используют более двух VH и VL.

[0225] В другом варианте осуществления другие модифицированные антитела можно получать с использованием молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против MAdCAM. Например, "каппа-антитела" (Ill et al., *Protein Eng*, 10: 949-57(1997)), "миниантитела" (Martin et al., *EMBO J*, 13: 5303-9(1994)), "диантитела" (Holliger et al., *PNAS USA*, 90: 6444-6448(1993)) или "янусины" (Traunecker et al., *EMBO J*, 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al., "Janusin: new molecular design for bispecific reagents", *Int J Cancer Suppl*, 7:51-52 (1992)) можно получать с использованием стандартных способов молекулярной биологии в соответствии с идеями настоящего описания.

[0226] В другом аспекте можно получать химерные и биспецифические антитела. Можно получать химерное антитело, которое содержит CDR и каркасные области из различных антител. В предпочтительном варианте осуществления CDR химерного антитела содержит все CDR вариабельной области легкой цепи или тяжелой цепи антитела человека против MAdCAM, в то время как каркасные области происходят из одного или нескольких других антител. В более предпочтительном варианте осуществления CDR химерного антитела включают все CDR вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи антитела человека против MAdCAM. Каркасные области могут быть из другого вида и в предпочтительном варианте осуществления могут быть гуманизированными. Альтернативно каркасные области могут быть из другого антитела человека.

[0227] Можно получать биспецифическое антитело, которое специфически связывается с MAdCAM через один связывающий домен и со второй молекулой через второй связывающий домен. Биспецифическое антитело можно получать с использованием рекомбинантных молекулярно-биологических способов, или их можно физически конъюгировать друг с другом. Кроме того, можно получать одноцепочечное антитело, содержащее более одной VH и VL, которое специфически связывается с MAdCAM и с другой молекулой. Такие биспецифические антитела можно получать с

использованием способов, которые хорошо известны, например, согласно (i) и (ii) см., например, Fanger et al., Immunol Methods 4: 72-81 (1994) и Wright and Harris, *выше*, и согласно (iii) см., например, Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52 (1992). В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело связывается с MAdCAM и с другой молекулой, экспрессируемой на высоком уровне на эндотелиальных клетках. В более предпочтительном варианте осуществления другая молекула представляет собой VCAM, ICAM или L-селектин.

[0228] В различных вариантах осуществления модифицированные антитела, описанные выше, получают с использованием одной или нескольких переменных областей или одной или нескольких областей CDR из одного из антител, выбранных из 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod или 7.26.4-mod. В другом варианте осуществления модифицированные антитела получают с использованием одной или нескольких из переменных областей или одной или нескольких областей CDR, аминокислотная последовательность которых приведена в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66, 68, 148 или 150 или нуклеотидная последовательность которых приведена в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 или 149.

Дериватизированные и меченые антитела

[0229] Антитело или часть антитела по изобретения могут быть дериватизированы или связаны с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). Как правило, антитела или их части дериватизируют, дериватизация или мечение не оказывали неблагоприятного влияния на связывание MAdCAM. Таким образом, подразумевается, что антитела и части антител по изобретению включают как интактные, так и модифицированные формы антител человека против MAdCAM, описанных в настоящем описании. Например, антитело или часть антитела по изобретению могут быть функционально связаны (путем химического присоединения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулярными структурами, такими как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диантитело), средство детекции, цитотоксическое средство, фармацевтическое средство, и/или белок или пептид, которые могут опосредовать связывание антитела или части антитела с другой молекулой (такие как основная область стрептавидина или полигистидиновая метка).

[0230] Один тип дериватизированного антитела получают путем сшивания двух или более антител (одного и того же типа или различных типов, например, для получения биспецифических антител). Подходящие сшивающие линкеры включают сшивающие линкеры, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две по-разному реакционноспособных группы, разделенных подходящим спейсером (например, малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир), или

гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры доступны от Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

[0231] Другим типом дериватизированного антитела является меченое антитело. Пригодные средства детекции, посредством которых антитело или часть антитела могут быть дериватизированы, включают флуоресцентные соединения, включая флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, 5-диметиламин-1-нафталинсульфонилхлорид, фикоэритрин, люминофоры на основе комплексов лантанидов и т.п. Антитело также может быть мечено ферментами, пригодными для детекции, такими как пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза, глюкозооксидаза и т.п. Когда антитело мечено поддающимся обнаружению ферментом, его детекцию проводят добавлением дополнительных реагентов, которые используются ферментом для продуцирования продукта реакции, который может быть определен. Например, когда присутствует средство пероксидаза хрена добавление пероксида водорода и диаминобензидина обеспечивает окрашенный продукт реакции, который поддается обнаружению. Антитело можно метить биотином и подвергать детекции путем непрямого определения связывания авидина или стрептавидина. Антитело может быть мечено магнитным средством, таким как гадолиний. Антитело может быть мечено заданным полипептидным эпитопом, распознаваемым вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, участки связывания для вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки связаны через спейсеры различной длины для уменьшения потенциального пространственного препятствования.

[0232] Антитело против MAdCAM также можно метить радиоактивно меченной аминокислотой. Радиоактивную метку можно использовать как для диагностических, так и для терапевтических целей. Например, радиоактивную метку можно использовать для детекции тканей, экспрессирующих MAdCAM, с использованием рентгенографии или других способов диагностики. Кроме того, радиоактивную метку можно использовать терапевтически в качестве токсина для пораженной заболеванием ткани или экспрессирующих MAdCAM опухолей. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующие радиоизотопы или радионуклиды - ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

[0233] Антитело против MAdCAM также может быть дериватизировано химической группой, такой как полиэтиленгликоль (PEG), метильная или этильная группа, или углеводная группа. Эти группы могут быть пригодными для улучшения биологических характеристик антитела, например, для повышения времени полужизни в сыворотке или для увеличения связывания с тканью. Эта методология также может быть использована для антигенсвязывающих фрагментов или версий антител против MAdCAM.

Фармацевтические композиции и наборы

[0234] В следующем аспекте изобретение относится к композициям, содержащим ингибиторное антитело против MAdCAM, и к способам лечения индивидуумов такими

композициями. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом, подвергаемым лечению, является человек. В других вариантах осуществления индивидуумом является ветеринарный субъект. В некоторых вариантах осуществления ветеринарным субъектом является собака или не являющийся человеком примат.

[0235] Лечение может вовлекать введение одного или нескольких ингибиторных моноклональных антител против MAdCAM или их антигенсвязывающих фрагментов отдельно или с фармацевтически приемлемым носителем. Ингибиторные антитела против MAdCAM по изобретению и композиции, содержащие их, можно вводить в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими, диагностическими или профилактическими средствами. Дополнительные терапевтические средства включают противовоспалительные или иммуномодулирующие средства. Эти средства включают, но не ограничиваются ими, местные и пероральные кортикостероиды, такие как преднизолон, метилпреднизолон, NCX-1015 или будезонид; аминосалицилаты, такие как месалазин, олсалазин, балсалазид или NCX-456; класс иммуномодуляторов, таких как азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, циклоспорин, FK506, IL-10 (Илодекакин), IL-11 (Опрелевкин), IL-12, антагонисты MIF/CD74, антагонисты CD40, такие как TNX-100/5-D12, антагонисты OX40L, GM-CSF, пимекролимус или рапамицин; класс средств против TNF α , таких как инфликсимаб, адалимумаб, CDP-870, онерцепт, этанерцепт; класс противовоспалительных средств, таких как PDE-4 (рофлумиласт и т.д.), ингибиторы TACE (DPC-333, RDP-58 и т.д.) и ингибиторы ICE (VX-740 и т.д.) а также антагонисты рецептора IL-2, такие как даклизумаб, класс селективных антагонистов молекул адгезии, таких как натализумаб, MLN-02 или аликафорсен, классы болеутоляющих средств, таких как, но не ограничиваясь ими, ингибиторы COX-2, такие как рофекоксиб, вальдекоксиб, целекоксиб, модуляторы потенциалзависимых каналов P/Q-типа ($\alpha\delta$), такие как габапентин и прегабалин, антагонисты рецепторов NK-1, модуляторы каннабиноидных рецепторов и агонисты дельта-опиоидных рецепторов, а также антинеопластические, противоопухолевые, антиангиогенные и химиотерапевтические средства. Такие дополнительные средства могут быть включены в той же композиции или могут быть введены отдельно. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько ингибиторных антител против MAdCAM по изобретению можно использовать в качестве вакцины или в качестве адъювантов вакцины. В частности, поскольку MAdCAM экспрессируется в лимфоидной ткани, вакцинные антигены могут быть преимущественно нацелены на лимфоидную ткань путем конъюгации антигена с антителом против MAdCAM по изобретению.

[0236] Как используют в рамках изобретения, "фармацевтически приемлемый носитель" означает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, обеспечивающие изотоничность и усиливающие или замедляющие всасывание средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Некоторыми примерами фармацевтически приемлемых носителей являются вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, ацетатный буфер с

хлоридом натрия, декстроза, глицерин, полиэтиленгликоль, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях является предпочтительным включение обеспечивающих изотоничность средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия в композицию. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются поверхностно-активные вещества, смачивающие вещества и небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие вещества или эмульгаторы, консерванты или буферы, которые повышают срок хранения или эффективность антитела.

[0237] Композиции по настоящему изобретению могут иметь различные формы, например, дозированные формы в виде жидкости, твердого полутвердого вещества и твердого вещества, такие как жидкие растворы (например, инъеклируемые и инфузируемые растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, лиофилизированный кек, сухие порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции имеют форму инъекционных или инфузируемых растворов, таких как композиции, сходные с композициями, используемыми для пассивной иммунизации человека. Предпочтительным путем введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный, внутрикожный). В предпочтительном варианте осуществления антитело вводят посредством внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело вводят посредством внутримышечной, внутрикожной или подкожной инъекции.

[0238] Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть составлена в качестве раствора, лиофилизированного кек, сухого порошка, микроэмульсии, дисперсии, липосом или другой упорядоченной структуры, пригодной для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения антитела против MAdCAM в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, приведенных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые обеспечивают порошок активного ингредиента вместе с каким-либо дополнительным желательным ингредиентом из их предварительно стерилизованного раствора. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из ингредиентов, перечисленных выше. Желательные характеристики раствора можно поддерживать, например, с использованием поверхностно-активных веществ и требуемого размера частиц в случае дисперсии с использованием поверхностно-активных веществ, фосфолипидов и полимеров. Длительного всасывания

инъекционных композиций можно достигать путем включения в композицию средства, которое замедляет всасывание, например, моностеаратов, полимерных материалов, масел и желатина.

[0239] Антитела по настоящему изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области, хотя для многих терапевтических применений предпочтительным путем/способом введения является подкожная, внутримышечная, внутрикожная или внутривенная инфузия. Как будет понятно специалисту в данной области путь и/или способ введения варьируется в зависимости от требуемых результатов.

[0240] В определенных вариантах осуществления композиции антител можно получать с носителем, который защищает антитело против быстрого высвобождения, таким как состав контролируемого высвобождения, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биodeградируемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978)).

[0241] В определенных вариантах осуществления антитело против MAdCAM по изобретению можно вводить перорально, например, с использованием инертного разбавителя или усвояемого пищевого носителя. Соединение (и другие ингредиенты, если желательно) также можно заключать в твердую или мягкую желатиновую капсулу, прессовать в таблетки или включать непосредственно в рацион индивидуума. Для перорального терапевтического введения антитела против MAdCAM можно включать с эксципиентами и использовать в форме проглатываемых таблеток, буккальных таблеток, лепешек, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и т.д. Для введения соединения по изобретению путем, отличным от парентерального введения, может быть необходимым покрывать соединение посредством или вводить соединение совместно с материалом, предупреждающим его инактивацию.

[0242] Композиции по изобретению могут включать "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" антитела или антигенсвязывающей части по изобретению. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела или части антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как заболевание, возраст, пол и масса тела индивидуума, и способность антитела или части антитела индуцировать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, в котором любые токсические или вредоносные эффекты антитела или части антитела перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

"Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, поскольку профилактическую дозу используют у индивидуумов до или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество может быть меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

[0243] Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, можно вводить однократный болюс, можно вводить несколько разделенных доз на протяжении периода времени или дозу можно пропорционально снижать или увеличивать в зависимости от потребностей терапевтической ситуации. Особенно предпочтительным является составление парентеральных композиций в виде единичной дозированной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Единичная дозированная форма, как используют в рамках изобретения, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных дозировок для млекопитающих, подвергаемых лечению; причем каждая единица содержит заданное количество активного соединения, вычисленное для достижения желаемого терапевтического эффекта, совместно с требуемым фармацевтическим носителем. Характеристики единичных дозированных форм по изобретению определяются и прямо зависят от (а) уникальных характеристик антитела против MAdCAM или его части и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, который намереваются достигнуть, и (b) ограничений, присущих области составления такого антитела, в отношении лечения чувствительности у индивидуума.

[0244] Иллюстративный неограничивающий диапазон для терапевтически или профилактически эффективного количества антитела или части антитела по изобретению составляет от 0,025 до 50 мг/кг, более предпочтительно от 0,1 до 50 мг/кг, более предпочтительно 0,1-25, 0,1-10 или 0,1-3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления состав содержит 5 мг/мл антитела в буфере из 20 mM ацетата натрия, pH 5,5, 140 mM NaCl и 0,2 мг/мл полисорбата 80. Следует отметить, что дозировки могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего смягчению. Кроме того, понятно, что для любого конкретного индивидуума конкретные режимы дозирования следует корректировать с течением времени в зависимости от потребности индивидуума и профессионального мнения лица, проводящего введение или надзор за введением композиций, и что дозированные диапазоны, указанные в настоящем описании, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или практики заявленной композиции.

[0245] Другой аспект настоящего изобретения относится к наборам, содержащим антитело против MAdCAM или часть антитела по изобретению или композицию, содержащую такое антитело. Набор может включать, в дополнение к антителу или композиции, диагностические или терапевтические средства. Также набор может включать

инструкции по применению в диагностическом или терапевтическом способе. В предпочтительном варианте осуществления набор включает антитело или композицию, содержащую его, и диагностическое средство, которое можно использовать в способе, описанном ниже. В другом предпочтительном варианте осуществления набор включает антитело или композицию, содержащую его, и одно или несколько терапевтических средств, которые можно использовать в способе, описанном ниже.

Генная терапия

[0246] Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, посредством генной терапии. Терапия может представлять собой терапию либо *in vivo*, либо *ex vivo*. В предпочтительном варианте осуществления пациенту вводят молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих как тяжелую цепь, так и легкую цепь. В более предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот вводят так, чтобы они стабильно встраивались в хромосомы В-клеток, поскольку эти клетки специализируются на продуцировании антител. В предпочтительном варианте осуществления В-клетки-предшественники трансфицируют или инфицируют *ex vivo* и обратно трансплантируют пациенту, нуждающемуся в этом. В другом варианте осуществления В-клетки предшественники или другие клетки инфицируют *in vivo* с использованием рекомбинантного вируса, о котором известно, что он инфицирует представляющий интерес тип клеток. Типичные векторы, используемые для генной терапии, включают липосомы, плазмиды и вирусные векторы. Иллюстративными вирусными векторами являются ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы. После инфицирования либо *in vivo*, либо *ex vivo*, можно проводить мониторинг уровней экспрессии антител путем взятия образца от подвергнутого лечению пациента и использования любого иммуноанализа, известного в данной области или описанного в настоящем описании.

[0247] В предпочтительном варианте осуществления способ генной терапии включает стадии введения выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела против MAdCAM и экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления способ генной терапии включает стадии введения выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела против MAdCAM и экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты. В более предпочтительном способе способ генной терапии включает стадии введения выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела против MAdCAM по изобретению и экспрессии молекул нуклеиновой кислоты. Способ генной терапии также может включать стадию введения другого противовоспалительного или иммуномодулирующего средства.

Диагностические способы применения

[0248] Антитела против MAdCAM можно использовать для обнаружения

MAdCAM в биологическом образце *in vitro* или *in vivo*. Антитела против MAdCAM можно использовать в традиционном иммуноанализе, включая, но не ограничиваясь ими, ELISA, RIA, FACS, иммуногистохимию тканей, вестерн-блоттинг или иммунопреципитацию. Антитела против MAdCAM можно использовать для детекции MAdCAM человека. В другом варианте осуществления антитела против MAdCAM можно использовать для детекции MAdCAM приматов Старого Света, таких как яванские макаки и макаки-резус, шимпанзе и человекообразные обезьяны. Изобретение относится к способу детекции MAdCAM в биологическом образце, включающему приведение биологического образца в контакт с антителом против MAdCAM по изобретению и детекцию антитела, связавшегося с MAdCAM. В одном варианте осуществления антитело против MAdCAM является прямо дериватизированным поддающейся обнаружению меткой. В другом варианте осуществления антитело против MAdCAM (первое антитело) является немеченым, а второе антитело или другая молекула, которая может связываться с антителом против MAdCAM, являются мечеными. Как хорошо известно специалисту в данной области, второе антитело выбирают так, чтобы оно было способно специфически связывать определенный вид и класс первого антитела. Например, если антитело против MAdCAM представляет собой IgG человека, тогда вторичное антитело может представлять собой антитело против IgG человека. Другие молекулы, которые могут связываться с антителами, включают, но не ограничиваются ими, белок А и белок G, оба из которых являются коммерчески доступными, например, от Pierce Chemical Co.

[0249] Подходящие метки для антитела или вторичного антитела описаны выше и включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, магнитные агенты и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; пример магнитного агента включает гадолиний; и примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

[0250] В альтернативном варианте осуществления MAdCAM можно оценивать в биологическом образце посредством конкурентного иммуноанализа с использованием стандартов MAdCAM, меченных поддающимся детекции веществом, и немеченого антитела против MAdCAM. В этом анализе биологический образец, меченые стандарты MAdCAM и антитело против MAdCAM объединяют и определяют количество меченого стандарта MAdCAM, связанного с немеченым антителом. Количество MAdCAM в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого стандарта MAdCAM, связанного с антителом против MAdCAM.

[0251] Способы иммуноанализа, описанные выше, можно использовать для ряда

целей. В одном варианте осуществления антитела против MAdCAM можно использовать для обнаружения MAdCAM в клетках в клеточной культуре. В предпочтительном варианте осуществления антитела против MAdCAM можно использовать для определения уровня экспрессии на клеточной поверхности MAdCAM после обработки клеток различными соединениями. Этот способ можно использовать для тестирования соединений, которые можно использовать для активации или ингибирования MAdCAM. В этом способе один образец клеток обрабатывают исследуемым соединением в течение некоторого периода времени, в то время как другой образец оставляют необработанным, затем экспрессию на клеточной поверхности можно определять с использованием проточной цитометрии, иммуногистохимии, вестерн-блоттинга, ELISA или RIA. Кроме того, способы анализа можно увеличивать в масштабе для высокопроизводительного скрининга для тестирования большого количества соединений либо для активации, либо для ингибирования MAdCAM.

[0252] Антитела против MAdCAM также можно использовать для определения уровней MAdCAM в ткани или клетках, происходящих из ткани. В предпочтительном варианте осуществления ткань представляет собой пораженную заболеванием ткань. В более предпочтительном варианте осуществления ткань представляет собой воспаленную ткань желудочно-кишечного тракта или ее биоптат. В предпочтительном варианте осуществления способа ткань или ее биоптат извлекают из пациента. Затем ткань или биоптат используют в иммуноанализе для определения, например, уровней MAdCAM, уровней MAdCAM на клеточной поверхности или локализации MAdCAM с использованием способов, описанных выше. Способ можно использовать для определения того, экспрессирует ли воспаленная ткань MAdCAM на высоком уровне.

[0253] Описанный выше диагностический способ можно использовать для определения того, экспрессирует ли ткань высокие уровни MAdCAM, что может указывать на то, что ткань будет хорошо отвечать на лечение антителом против MAdCAM. Кроме того, диагностический способ также можно использовать для определения того, вызывает ли лечение антителом против MAdCAM (см. ниже) экспрессию тканью более низких уровней MAdCAM, и, таким образом, его можно использовать для того, чтобы определить, является ли лечение успешным.

[0254] Антитела по настоящему изобретению также можно использовать *in vivo* для определения положения тканей и органов, которые экспрессируют MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления антитела против MAdCAM можно использовать для определения локализации воспаленной ткани. Преимущество антител против MAdCAM по настоящему изобретению состоит в том, что они не будут генерировать иммунный ответ при введении. Способ включает стадии введения антитела против MAdCAM или его фармацевтической композиции пациенту, нуждающемуся в таком диагностическом тесте, и проведение визуализирующего анализа у индивидуума для определения положения экспрессирующих MAdCAM тканей. Визуализирующий анализ хорошо известен в области медицины и включает, но не ограничивается ими,

рентгенографический анализ, гамма-сцинтиграфию, магнитно-резонансную томографию (MRI), позитронно-эмиссионную томографию или компьютерную томографию (СТ). В другом варианте осуществления способа биоптат получают от пациента для определения того, экспрессирует ли представляющая интерес ткань MAdCAM, вместо проведения визуализирующего анализа у пациента. В предпочтительном варианте осуществления антитела против MAdCAM можно метить поддающимся обнаружению средством, которое можно визуализировать у пациента. Например, антитело можно метить контрастным средством, таким как барий, которое можно использовать для рентгенографического анализа, или магнитным контрастным средством, таким как хелат гадолиния, которое можно использовать для MRI или СТ. Другие средства для мечения включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, такие как ^{99}Tc . В другом варианте осуществления антитело против MAdCAM является немеченым и его визуализируют путем введения второго антитела или другой молекулы, которая поддается обнаружению и которая связывается с антителом против MAdCAM.

[0255] Антитела против MAdCAM по изобретению также можно использовать для определения уровней растворимого MAdCAM, присутствующего в донорской крови, сыворотке, плазме или другой биологической жидкости, включая, но не ограничиваясь ими, образец кала, мочи, мокроты или биоптат. В предпочтительном варианте осуществления биологической жидкостью является плазма. Затем биологическую жидкость используют в способе иммуноанализа для определения уровней растворимого MAdCAM. Растворимый MAdCAM может представлять собой суррогатный маркер текущего желудочно-кишечного воспаления, и способ обнаружения можно использовать в качестве диагностического маркера для определения тяжести заболевания.

[0256] Описанный выше диагностический способ можно использовать для определения того, экспрессируются ли у индивидуума высокие уровни растворимого MAdCAM, которые могут указывать на то, что индивидуум будет хорошо отвечать на лечение антителом против MAdCAM. Кроме того, диагностический способ также можно использовать для определения того, вызывает ли лечение антителом против MAdCAM (см. ниже) или другим фармацевтическим средством заболевания экспрессию у индивидуума более низких уровней MAdCAM и, таким образом, его можно использовать для определения того, является ли лечение успешным.

Ингибирование зависимой от $\alpha\beta_1$ /MAdCAM адгезии посредством антитела против MAdCAM:

[0257] В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против MAdCAM, которое связывает MAdCAM и ингибирует связывание и адгезию клеток, содержащих интегрин $\alpha\beta_1$ или другие распознаваемые лиганды, такие как L-селектин, с MAdCAM. В предпочтительном варианте осуществления MAdCAM представляет MAdCAM человека и либо представляет собой растворимую форму, либо экспрессируется на поверхности клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM представляет собой антитело человека. В другом варианте

осуществления антитело или его часть ингибирует связывание между $\alpha\beta$ и MAdCAM с величиной IC_{50} не более 50 нМ. В предпочтительном варианте осуществления величина IC_{50} составляет не более 5 нМ. В более предпочтительном варианте осуществления величина IC_{50} составляет менее 5 нМ. В более предпочтительном варианте осуществления величина IC_{50} составляет менее 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,03 мкг/мл. В другом предпочтительном варианте осуществления величина IC_{50} составляет менее 0,5 мкг/мл, 0,4 мкг/мл или 0,3 мкг/мл. Величину IC_{50} можно определять любым способом, известным в данной области. Как правило, величину IC_{50} можно определять посредством ELISA или анализа адгезии. В предпочтительном варианте осуществления величину IC_{50} определяют посредством анализа адгезии с использованием либо клеток или ткани, которые естественным образом экспрессируют MAdCAM, либо клеток или тканей, которые модифицированы способами инженерии для экспрессии MAdCAM.

Ингибирование привлечения лимфоцитов в ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань посредством антител против MAdCAM

[0258] В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против MAdCAM, которое связывает естественным образом экспрессируемый MAdCAM и ингибирует связывание лимфоцитов со специализированной желудочно-кишечной лимфоидной тканью. В предпочтительном варианте осуществления естественным образом экспрессируемый MAdCAM представляет собой MAdCAM человека или примата и либо представляет собой растворимую форму, либо экспрессируется на поверхности клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против MAdCAM представляет собой антитело человека. В другом варианте осуществления антитело или его часть ингибирует привлечение тропных к кишечнику $\alpha_4\beta_7^+$ лимфоцитов в ткани, экспрессирующие MAdCAM, с величиной IC_{50} не более 5 мг/кг. В предпочтительном варианте осуществления величина IC_{50} составляет не более 1 мг/кг. В более предпочтительном варианте осуществления величина IC_{50} составляет менее 0,1 мг/кг. В одном варианте осуществления величину IC_{50} можно определять путем определения взаимосвязи доза-эффект для привлечения меченных технецием лимфоцитов периферической крови человека в желудочно-кишечный тракт с использованием гамма-сцинтиграфии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. В другом варианте осуществления величину IC_{50} можно определять путем определения увеличения уровня тропных к кишечнику $\alpha_4\beta_7^+$ лимфоцитов, таких как, но не ограничиваясь ими, $CD4^+ \alpha_4\beta_7^+$ Т-клетки памяти, в периферическом кровотоке с использованием проточной цитометрии в зависимости от дозы антитела против MAdCAM.

[0259] Чтобы изобретение стало более понятным, приведены следующие примеры. Эти примеры предназначены только для иллюстрации, и их не следует истолковывать как ограничивающие объем изобретения каким-либо образом.

ПРИМЕР 1:

Получение гибридом, продуцирующих антитела против MAdCAM

[0260] Антитела по изобретению получали, анализировали и подвергали селекции в

соответствии с настоящим примером

Получение первичного иммуногена:

[0261] Получали два иммуногена для иммунизации мышей XenoMouse™: (i) слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁ и (ii) клеточные мембраны, полученные из клеток, стабильно трансфицированных MAdCAM.

(i) Слитый белок MAdCAM-Fc-IgG₁

Конструирование экспрессирующего вектора:

[0262] Фрагмент кДНК EcoRI/BglII, кодирующий зрелый внеклеточный иммуноглобулин-подобный домен MAdCAM, вырезали из клона pINCY Incyte (3279276) и клонировали в участки EcoRI/BamHI вектора pIG1 (Simmons, D. L. (1993), Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, ed. Hartley, D. A. (Oxford Univ. Press, Oxford), pp. 93-127.) для достижения слияния с Fc IgG₁ в рамке считывания. Полученную вставку вырезали с использованием EcoRI/NotI и клонировали в pcDNA3.1+ (Invitrogen). Последовательность кДНК MAdCAM-Fc IgG₁ в векторе подтверждали. Аминокислотная последовательность слитого белка MAdCAM-Fc IgG₁ представлена ниже:

Слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁:

MDFGLALLLAGLLGLLLGQSLQVKPLQVEPEPVVAVALGASRQLTCRLACA
DRGASVQWRGLDTSLGAVQSDTGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGSCGGRTFQHTV
QLLVYAFPDQLTVSPAA
LVPGDPEVACTAHKVTPVDPNALSFSLLVGGQELEGAQALGPEVQEEEEEPQGDE
DVLFRTV
ERWRLPPLGTPVPPALYCQATMRLPGLELSHRQAIPVLHSPTSPEPPDTTSPESPDT
TSPES
PDTTSQEPPDTTSQEPPDTTSQEPPDTTSPEPPDKTSPEPAPQQGSTHTPRSPGSTRT
RRPEIQPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPV
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 107)

Подчеркнуто: сигнальный пептид

Полужирный шрифт: Внеклеточный домен MAdCAM

Экспрессия/очистка рекомбинантного белка:

[0263] Клетки CHO-DHFR трансфицировали вектором pcDNA3.1+, содержащим кДНК слитого белка MAdCAM-Fc IgG₁, и стабильные клоны, экспрессирующие слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁, подвергали селекции на среде Искова, содержащей 600 мкг/мл G418 и 100 нг/мл метотрексата. Для экспрессии белка в биореактор в виде полого волокна проводили посев клеток CHO, стабильно экспрессирующих MAdCAM-Fc IgG₁, в среде Искова, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку с низким уровнем IgG

(Gibco), неосновные аминокислоты (Gibco), 2 mM глутамин (Gibco), пируват натрия (Gibco), 100 мкг/мл G418 и 100 нг/мл метотрексата, и использовали для получения концентрированного супернатанта среды. Слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁ очищали из собранного супернатанта посредством аффинной хроматографии. В кратком изложении, супернатант наносили на колонку HiTrap Protein G Sepharose (5 мл, Pharmacia) (2 мл/мин), промывали 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl (5 объемов колонки) и элюировали 100 mM глицином pH 2,5 (1 мл/мин), немедленно нейтрализуя фракции до pH 7,5 с использованием 1 M Tris pH 8. Фракции, содержавшие слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁, идентифицировали посредством SDS-PAGE, объединяли и наносили на колонку Sephacryl S100 (Pharmacia), предварительно уравновешенную 35 mM BisTris, pH 6,5, 150 mM NaCl. Гель-фильтрацию проводили со скоростью 0,35 мл/мин, собирая пиковую фракцию слитого белка MAdCAM-Fc IgG₁ приблизительно в 3 фракциях по 5 мл. Эти образцы объединяли и наносили на колонку Resource Q (6 мл, Pharmacia), предварительно уравновешенную 35 mM BisTris, pH 6,5. Колонку промывали 5 объемами колонки 35 mM Bis Tris pH 6,5, 150 mM NaCl (6 мл/мин) и слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁ элюировали во фракции объемом 4-6 мл с 35 mM Bis Tris, pH 6,5, 400 mM NaCl. На этой стадии белок был на 90% чистым и мигрировал в качестве одной полосы, соответствующей размеру 68 кДа, при SDS-PAGE. Для применения в качестве иммуногена и для всех последующих способов анализа в материале проводили замену буфера на 25 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 50% глицерин и хранили в качестве аликвот при -80°C.

(ii) Клеточные мембраны, стабильно экспрессирующие MAdCAM

[0264] Фрагмент SacI/NotI, содержащий нуклеотиды 645-1222 опубликованной последовательности MAdCAM (Shyjan AM, et al., J Immunol., 156, 2851-7 (1996)), амплифицировали с использованием ПЦР из библиотеки кДНК толстого кишечника и клонировали в участки SacI/NotI вектора pIND-Hygro (Invitrogen). Фрагмент SacI, содержащий дополнительную 5'-кодирующую последовательность, субклонировали в эту конструкцию из pcDNA3.1 MAdCAM-Fc IgG₁, с получением полноразмерной кДНК MAdCAM. Затем фрагмент KpnI/NotI, содержащий кДНК MAdCAM, клонировали в соответствующие участки в векторе pEF5FRTV5GWCAT (Invitrogen), заменяя кодирующую последовательность CAT. Вставку кДНК подтверждали посредством секвенирования и использовали для трансфекции для получения единичных стабильно экспрессирующих клонов в клетках FlpIn NIH 3T3 (Invitrogen) посредством технологии с рекомбиназой Flp, в соответствии с инструкциями изготовителя. Селекцию стабильно экспрессирующих клонов проводили по их способности поддерживать связывание $\alpha_4\beta_7^+$ JY линии В-лимфобластоидных клеток человека (Chan BM, et al, J. Biol. Chem., 267:8366-70 (1992)), описанных ниже. Стабильные клоны клеток CHO, экспрессирующих MAdCAM, получали аналогичным образом с использованием клеток FlpIn CHO (Invitrogen).

[0265] Экспрессирующие MAdCAM клетки FlpIn NIH-3T3 выращивали в модифицированной способом Дульбекко среде Игла (Gibco), содержавшей 2 mM L-

глутамин, 10% донорскую телячью сыворотку (Gibco) и 200 мкг/мл гигромицина В (Invitrogen) и увеличивали в количестве во вращающихся флаконах. Экспрессирующие MAdCAM клетки FlpIn CHO выращивали в среде Хэма F12/модифицированной способом Дульбекко среде Игла (Gibco), содержащей 2 mM L-глутамин, 10% донорскую телячью сыворотку (Gibco) и 350 мкг/мл гигромицина В (Invitrogen) и увеличивали в количестве во вращающихся флаконах. Клетки собирали с использованием неферментного раствора для диссоциации клеток (Sigma) и соскабливания с промыванием в фосфатно-солевом буфере посредством центрифугирования. Клеточные мембраны получали из клеточного осадка посредством двух раундов гомогенизации на политроне в 25 mM Bis Tris pH 8, 10 mM MgCl₂, 0,015% (масс./об.) аprotинина, 100 Е/мл бацитрацина и центрифугирования. Конечный осадок ресуспендировали в том же буфере и 50×10^6 эквивалентов клеток распределяли аликвотами в пробирки Eppendorf с толстыми стенками и центрифугировали при $>100000\text{ g}$ с получением осадков клеточных мембран для иммунизации мышей XenoMouse. Супернатант декантировали и мембраны хранили в пробирках Eppendorf при -80°C до тех пор, пока не потребуется. Подтверждение экспрессии белка в клеточных мембранах проводили посредством SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителом кролика против пептида, индуцированным против N-концевых остатков MAdCAM ([C]-KPLQVERPER).

Иммунизация и получение гибридом:

[0266] Мышей XENOMOUSE™ в возрасте от восьми до десяти недель иммунизировали внутрибрюшинно или в подушечки их задних лап либо очищенным рекомбинантным слитым белком MAdCAM-Fc IgG₁ (10 мкг/доза/мышь), либо клеточными мембранами, полученными либо из стабильно экспрессирующих клеток MAdCAM-CHO, либо из NIH 3T3 (10×10^6 клеток/доза/мышь). Введение этой дозы повторяли от пяти до семи раз на протяжении периода от трех до восьми недель. За четверо суток до слияния мышам проводили конечную инъекцию внеклеточного домена MAdCAM человека в PBS. Лимфоциты селезенки и лимфатических узлов иммунизированных мышей подвергали слиянию с несекреторной миеломной клеточной линией P3-X63-Ag8.653 и подвергали селекции с НАТ, как описано ранее (Galfre and Milstein, Methods Enzymol. 73:3-46 (1981)). Панель гибридом, все из которых секретировали специфичные к MAdCAM антитела человека IgG2κ и IgG4κ, выделяли и субклонировали. Двенадцать субклонов гибридом, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 и 9.8.2, продуцирующих моноклональные антитела, специфичные к MAdCAM, выделяли и подвергали детекции с использованием способов анализа, описанных ниже. Все из родительских линий 1.7. 1.8. 6.14. 6.22. 6.34. 6.67. 6.73. 6.77. 7.16. 7.20. 7.26 и 9.8, из которых происходили линии субклонов гибридом 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 и 9.8.2, обладали активностью, направленной против MAdCAM.

X481.2

[0267] Отобранный клон далее модифицировали способами инженерии для

удаления случайных случаев сплайсинга в конечном белке. Случайный случай сплайсинга приводил к продуцированию удлиненного белка. Было открыто, что удлинение было результатом сквозного прочтения, которое приводило к случайному событию сплайсинга. Без связи с теорией полагают, что случайный случай сплайсинга сводит вместе конец тяжелой цепи с областью, находящейся на 4244 п.н. ниже (в области последовательности, происходящей из SV40). Конструировали новый вектор для устранения этого наблюдаемого удлинения. Область тяжелой цепи модифицировали способами инженерии для замены нуклеотида на 3'-конце тяжелой цепи (замена с Т на А), что приводило к удалению донорного участка сплайсинга. Антитело против MAdCAM, полученное из этого модифицированного клона, представляет собой X481.2.

Способы анализа ELISA:

[0268] Детекцию антигенспецифических антител в сыворотке мыши и супернатанте гибридомы проводили посредством ELISA, как описано (Coligan et al., Unit 2.1 "enzyme-linked immunosorbent assays", Current Protocols in Immunology (1994)) с использованием слитого белка MAdCAM-Fc IgG₁ для улавливания антител. Для животных, иммунизированных слитым белком MAdCAM-Fc IgG₁, антитела подвергали скринингу в отношении неспецифической реактивности против IgG₁ человека и в отношении способности связываться с клетками FlpIn CHO MAdCAM посредством проточной цитометрии.

[0269] В предпочтительном способе анализа ELISA используют следующие способы:

[0270] Планшеты для ELISA покрывали в течение ночи при 4°C посредством 100 мкг/лунка слитой конструкции MAdCAM-Fc IgG₁ (4,5 мкг/мл) в планшете, содержащем буфер (100 mM буфер карбонат натрия/бикарбонат, pH 9,6). После инкубации буфер для нанесения покрытия удаляли и планшет блокировали 200 мкл/лунка блокирующего буфера (5% BSA, 0,1% Tween 20, в фосфатно-солевом буфере) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Блокирующий буфер удаляли и добавляли 50 мкл/лунка супернатанта гибридомы или другой сыворотки или супернатанта (например, положительный контроль) на 2 часа при комнатной температуре. После инкубации планшет промывали PBS (3100 мкл/лунка) и проводили детекцию связывания mAb гибридомы с конъюгированными с HRP вторичными антителами (т.е. антитело мыши против IgG₂ человека с HRP 1:1000 (SB, каталожный номер № 9060-05) для IgG₂-антител, или антителами мыши против IgG4 человека с HRP 1:1000 (Zymed, каталожный номер № 3840) для IgG4-антител), разбавленными в PBS. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, промывали PBS (3×100 мкл/лунка) и, наконец, проявляли посредством 100 мкл OPD (о-фенилендиамин (DAKO S2405) + 5 мкл 30% H₂O₂/12 мл). Планшетами позволяли проявиться в течение 10-20 и реакцию останавливали посредством 100 мкл 2 M H₂SO₄. Считывание планшетов проводили при 490 нм.

Анализ адгезии:

[0271] Антитела, которые демонстрировали связывание со слитым белком

MAdCAM-Fc IgG₁ посредством ELISA, оценивали в отношении активности антагониста в анализах адгезии с использованием клеток $\alpha_4\beta_7^+$ JY и либо (i) слитого белка MAdCAM-Fc IgG₁, либо (ii) клеток MAdCAM-CHO.

(i) Анализ слияния MAdCAM-Fc IgG₁

[0272] 100 мкл раствора 4,5 мкг/мл очищенного слитого белка MAdCAM-Fc IgG₁ в PBS Дульбекко адсорбировали на 96-луночные черные планшеты с u-образным дном Microfluor "B" (Dyplex #7805) в течение ночи при 4°C. Затем покрытые MAdCAM планшеты переворачивали и избыточную жидкость удаляли, а затем проводили блокирование при 37°C в течение по меньшей мере 1 часа в 10% BSA/PBS. В ходе этого времени подсчитывали культивируемые клетки JY с использованием исключения трипанового синего (должно было быть приблизительно 8×10^5 клеток/мл) и 20×10^6 клеток/планшет для анализа переносили пипеткой в 50-мл центрифужную пробирку. Клетки JY культивировали в среде RPMI1640 (Gibco), содержащей 2 mM L-глутамин и 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку (Life Technologies #10108-165) и высевали в количестве $1-2 \times 10^5$ /мл каждые 2-3 суток для предупреждения дифференцировки культуры. Клетки промывали два раза средой RPMI 1640 (Gibco), содержащей 2 mM L-глутамин (Gibco), посредством центрифугирования (240 g), ресуспендируя конечный клеточный осадок в количестве 2×10^6 клеток/мл в RPMI 1640 для нагрузки Calcein AM. Calcein AM (Molecular Probes #C-3099) добавляли к клеткам в разведении 1:200 в DMSO (приблизительная конечная концентрация 5 мкМ) и клетки защищали от действия света в ходе инкубации (37°C в течение 30 мин). В ходе этой стадии инкубации клеток антитела, подлежащие тестированию, разбавляли следующим образом: для тестирования однократной дозы антитела довели до 3 мкг/мл (конечная 1 мкг/мл) в 0,1 мг/мл BSA (Sigma#A3059) в PBS; для полных кривых IC₅₀ антитела разбавляли в 0,1 мг/мл BSA/PBS, причем максимальная концентрация составляла 3 мкг/мл (1 мкг/мл) с последующими разведениями в два раза (соотношение 1:2) по планшету. Последнюю лунку в ряду использовали для определения общего связывания, так что использовали 0,1 мг/мл BSA в PBS.

[0273] После блокирования содержимое планшетов удаляли встряхиванием и в каждую лунку добавляли 50 мкл антител/контролей, и планшет инкубировали при 37°C в течение 20 мин. В это время клетки нагруженные кальцеином JY промывали один раз средой RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, и один раз 1 мг/мл BSA/PBS посредством центрифугирования, ресуспендируя конечный клеточный осадок в 1×10^6 /мл в 1 мг/мл BSA/PBS. В каждую лунку планшета с U-образным дном добавляли 100 мкл клеток, планшет закрывали, кратковременно центрифугировали (1000 об/мин в течение 2 мин), а затем планшет инкубировали при 37°C в течение 45 мин. В конце этого времени планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Skatron и проводили измерение флуоресценции с использованием устройства для считывания Wallac Victor2 1420 Multilabel Reader (λ возбуждения 485 нм, λ испускания 535 нм, подсчет сверху, 8 мм от дна планшета, в течение 0,1 с нормальной

апертурой испускания). Для каждой концентрации антитела процентную адгезию выражали в качестве процента максимального флуоресцентного ответа в отсутствии какого-либо антитела минус флуоресценция, ассоциированная с неспецифическим связыванием. Величину IC_{50} определяют как концентрация антитела против MAdCAM, при которой адгезионный ответ снижается до 50% ответа в отсутствии антитела против MAdCAM. Считалось, что антитела, которые были способны ингибировать связывание клеток JY со слитой конструкцией MAdCAM-Fc IgG₁ с величиной $IC_{50} < 0,1$ мкг/мл, обладают высокой активностью антагониста, и их использовали далее в анализе адгезии MAdCAM-CHO. Все двенадцать протестированных Ab продемонстрировали мощную активность антагониста (таблица 3). Моноклональные антитела 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5 и 7.26.4 происходили из линий IgG2к, и моноклональные антитела 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1 и 9.8.2 происходили из линий IgG4к.

(ii) Анализ адгезии клеток MAdCAM-CHO

[0274] Клетки JY культивировали, как описано выше. Экспрессирующие MAdCAM клетки CHO получали с использованием конструкции кДНК pEF5FRT MAdCAM и с использованием технологии рекомбиназы Flp (Invitrogen), как описано выше. Селекцию единичных стабильных клонов клеток CHO, экспрессирующих MAdCAM, проводили, исходя из их способности поддерживать адгезию и связывание клеток JY, посредством проточной цитометрии, для антитела кролика против пептида, индуцированного против N-конца MAdCAM и описанного выше. Экспрессирующие MAdCAM клетки CHO культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco # 21331-020), содержащей 2 mM L-глутамин, 10% эмбриональную телячью сыворотку (Gibco) и 350 мкг/мл гигромицина В (Invitrogen), разделяя 1:5 каждые 2/3 суток. Для анализа адгезии экспрессирующие MAdCAM клетки CHO высевали в количестве 4×10^4 клеток/лунка в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном (Costar # 3904) в 200 мкл культуральной среды, и культивировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂.

[0275] На следующие сутки супернатант гибридомы или очищенное моноклональное антитело разбавляли от начальной концентрации 30 мкг/мл (эквивалентно конечной концентрации 10 мкг/мл) до 1 мг/мл посредством BSA/PBS, как описано выше. Для планшетов с MAdCAM CHO содержимое планшетов удаляли встряхиванием и в каждую лунку добавляли 50 мкл антител/контролей и планшет инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Последнюю лунку ряда использовали для определения общего связывания, так что использовали 0,1 мг/мл BSA в PBS. Клетки JY, нагруженные Calcein AM, в конечной концентрации 1×10^6 /мл в 1 мг/мл BSA/PBS получали, как описано выше, затем 100 мкл добавляли в планшет после инкубации с антителом в течение 20 мин. Затем планшет инкубировали при 37°C в течение 45 мин, затем промывали на устройстве для промывания планшетов Tescan (PW 384) и проводили измерение флуоресценции с использованием устройства для считывания планшетов Wallac, как описано выше. Для каждой концентрации антитела процентную адгезию выражали в качестве процента максимального флуоресцентного ответа в отсутствии

какого-либо антитела минус флуоресценция, ассоциированная с неспецифическим связыванием. Антитела, которые были способны ингибировать связывание клеток Ю с клетками MAdCAM CHO с величиной $IC_{50} < 1$ мкг/мл, считали имеющими высокую активность антагониста. Как указано выше, величину IC_{50} определяют как концентрация антитела против MAdCAM, при которой адгезионный ответ снижался до 50% от ответа в отсутствии антитела против MAdCAM.

Эффективность IC_{50} для 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 и 9.8.2 в этом анализе приведена ниже в таблице 3.

Таблица 3. Величины IC_{50} проиллюстрированных антител против MAdCAM

Клон	Слитая конструкция MAdCAM-Fc IgG ₁ , средняя IC_{50} (мкг/мл)	n	Анализ MAdCAM FlpIn CHO, средняя IC_{50} (мкг/мл)	n
1.7.2	0,030±0,011	6	0,502±0,280	9
1.8.2	0,027±0,011	4	0,424±0,107	8
7.16.6	0,019±0,011	7	0,389±0,093	16
7.20.5	0,025±0,027	7	0,387±0,202	9
7.26.4	0,021±0,040	4	0,574±0,099	15
6.14.2	0,011±0,005	4	0,291±0,096	6
6.22.2	0,018±0,011	4	0,573±0,168	7
6.34.2	0,013±0,008	4	0,285±0,073	7
6.67.1	0,013±0,070	4	0,298±0,115	8
6.73.2	0,020±0,010	4	0,369±0,103	8
6.77.1	0,022±0,004	4	0,520±0,100	4
9.8.2	0,020±0,050	4	0,440±0,342	8
IgG ₂				
IgG ₄				

[0276] Для определения эффективности mAb против MAdCAM в качестве антагонистов в проточных анализах в условиях сдвиговой нагрузки, которые предназначены для имитации микрососудистых условий на венах с высоким эндотелием, которые выполняют роль ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани, клетки CHO, экспрессирующие MAdCAM, высевали на стеклянные предметные микростекла (50×4 мм) и позволяли им прикрепиться с образованием смыкающегося монослоя (приблизительно $2,5 \times 10^5$ клеток). Затем клетки инкубировали с подвергнутым аффинной очистке mAb на протяжении ряда концентраций (0,1-10 мкг/мл) в течение 20 мин при 37°C, а затем подсоединяли к системе проточного анализа. В качестве отрицательного контроля использовали совпадающие по изотипу mAb IgG₂ или IgG₄ (10 мкг/мл). Нормальные донорные лимфоциты периферической крови человека (PBL)

перфузировали над монослоем клеток с постоянной сдвиговой нагрузкой 0,05 Па. Эксперименты подвергали видеорегистрации и вычисляли общую адгезию лимфоцитов (катящиеся+прочная адгезия). Было показано, что все из протестированных моноклональных антител являются мощными антагонистами в описанных условиях.

(iii) Анализ Стэмпера-Вудруфа

[0277] Для визуализации MAdCAM⁺ сосудов получали биотинилированное mAb против MAdCAM на 1-2 мг подвергнутого аффинной очистке белка с использованием 20-молярного избытка биотина-NHS (Pierce) в фосфатно-солевом буфере в соответствии с инструкциями изготовителя. Реакционной смеси позволяли осесть при комнатной температуре (30 мин) и обессоливали с использованием колонки PD-10 (Pharmacia) определяли концентрацию белка.

[0278] Нормальный лимфатический узел печени извлекали из донорного органа, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до применения. Получали 10-мкм криостатные срезы, сушили на покрытых поли-L-лизином предметных стеклах и фиксировали в ацетоне перед анализом. Срезу блокировали с использованием блокирующей системы авидин-биотин (DAKO), а затем инкубировали с биотинилированным mAb против MAdCAM на протяжении ряда концентраций (1-50 мкг/мл) при комнатной температуре (2 ч). В качестве отрицательного контроля использовали совпадающее по изотипу mAb IgG₂ или IgG₄ (50 мкг/мл) и в качестве положительного контроля использовали антитело против β_7 (50 мкг/мл).

[0279] Лимфоциты периферической крови человека, взятые от нормальных доноров, метили mAb мыши против CD2 человека (DAKO), чтобы обеспечить последующую визуализацию прикрепленных клеток. К каждому срезу лимфатического узла добавляли 5×10^5 PBL и инкубировали в течение 30 минут, а затем осторожно ополаскивали, чтобы избежать открепления прикрепленных клеток. Затем срезы повторно фиксировали в ацетоне и повторно инкубировали с биотинилированным mAb против MAdCAM (10 мкг/мл), а затем с биотинилированным антителом козы против mAb мыши (для распознавания меченных CD2 PBL и неокрашенных MAdCAM⁺ сосудов), а затем streptABcomplex/HRP (DAKO). Наконец, MAdCAM⁺ сосуды и меченные CD2 PBL визуализировали путем добавления субстрата DAB (DAKO) к срезам, причем коричневый продукт реакции демонстрирует области положительного окрашивания. Адгезию лимфоцитов количественно определяли путем подсчета количества лимфоцитов, прикрепившихся к 50 MAdCAM-1⁺ сосудам порталных трактов, вен или синусоидов. Затем данные, выраженные в качестве средних значений, нормализовывали к процентной адгезии с использованием адгезии PBL в отсутствие какого-либо антитела, взятой за 100%. Данные составляли, исходя из n=3 различных доноров PBL и для различных доноров лимфатических узлов печени. Репрезентативные данные для биотинилированных очищенных моноклональных антител 1.7.2 и 7.16.6 представлены на фиг.4 по сравнению с контролем в виде блокирующего антитела против β_7 .

Анализ селективности:

[0280] VCAM и фибронектин представляют собой близкие гомологи MAdCAM по структуре и последовательности. Подвергнутые аффинной очистки mAb против MAdCAM оценивали в отношении специфичности к MAdCAM путем определения их способности блокировать связывание $\alpha_4\beta_1^+/\alpha_5\beta_1^+$ Т-клеток Jurkat (ATCC) с распознаваемой ими молекулой клеточной адгезии. 100 мкл раствора связывающего клетки фрагмента фибронектина в концентрации 4,5 мкг/мл (110 кДа, Europa Bioproducts Ltd, каталожный номер № UBF4215-18) или VCAM (Panvera) в PBS Дульбекко адсорбировали на 96-луночные планшеты с u-образным дном Black Microfluor "B" (Dynex #7805) в течение ночи при 4°C. Затем покрытые планшеты переворачивали и избыток жидкости удаляли перед блокированием при 37°C в течение по меньшей мере 1 часа в 10% BSA/ PBS. В ходе этого времени подсчитывали культивированные Т-клетки Jurkat с использованием исключения трипанового синего и нагружали красителем Calcein AM, как описано выше для клеток JY выше. Антитела, подлежащие тестированию, разбавляли от максимальной концентрации 10 мкг/мл в 0,1 мг/мл BSA в PBS. Последнюю лунку ряда использовали для определения общего связывания, так что использовали 0,1 мг/мл BSA в PBS. Эхистатин (Bachem, каталожный номер № H-9010), приготовленный в PBS, использовали в максимальной концентрации 100 нМ для блокирования взаимодействия $\alpha_4\beta_1$ /фибронектин. mAb против CD106 (клон 51-10C9, BD Pharmingen, каталожный номер № 555645) в максимальной концентрации 1 мкг/мл, использовали для блокирования взаимодействия $\alpha_4\beta_1$ /VCAM.

[0281] После блокирования содержимого планшета удаляли встряхиванием и в каждую лунку добавляли 50 мкл антител/контролей, и планшет инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Нагруженные кальцеином Т-клетки Jurkat промывали один раз, как описано выше, ресуспендируя конечный клеточный осадок до 1×10^6 /мл в 1 мг/мл BSA/PBS. 100 мкл клеток добавляли в каждую лунку планшета с U-образным дном, планшет закрывали, кратковременно центрифугировали (1000 об/мин в течение 2 мин), а затем планшет инкубировали при 37°C в течение 45 мин. После этого планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Skatron и проводили измерение флуоресценции с использованием устройства для считывания Wallac Victor2 1420 Multilabel Reader (λ возбуждения 485 нм, λ испускания 535 нм, подсчет сверху, 8 мм от дна планшета, в течение 0,1 с нормальной апертурой испускания). Для каждого антитела степень ингибирования наглядно представлена ниже в таблице 4 (-отрицательное ингибирование адгезии, *** полное ингибирование адгезии). Все проиллюстрированные mAb являются мощными и селективными антагонистами MAdCAM, демонстрирующими селективность в отношении MAdCAM, значительно превышающую 100 раз, относительно селективности в отношении VCAM и фибронектина.

Таблица 4. Сравнительная селективность антитела против MAdCAM для MAdCAM относительно молекул клеточной адгезии, фибронектина и VCAM

Клон	Ингибирование анализе $\alpha_5\beta_1$ /фибронектином (10 мкг/мл)	Ингибирование в анализе с $\alpha_4\beta_1$ /VCAM (10 мкг/мл)	Ингибирование в анализе с $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM (0,1 мкг/мл)
1.7.2	-	-	*
1.8.2	-	-	*
7.16.6	-	-	*
7.20.5	-	-	*
7.26.4	-	-	*
6.14.2	-	-	*
6.22.2	-	-	*
6.34.2	-	-	*
6.67.1	-	-	*
6.73.2	-	-	*
6.77.1	-	-	*
9.8.2	-	-	*
IgG2			
IgG4			

[0282] Гибридомы депонированы в European Collection of Cell Cultures (ECACC), Н.Р.А в CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG 9 сентября 2003 года со следующими номерами депозитов:

Гибридома	Депозит №
1.7.2	03090901
1.8.2	03090902
6.14.2	03090903
6.22.2	03090904
6.34.2	03090905
6.67.1	03090906
6.73.2	03090907
6.77.1	03090908
7.16.6	03090909
7.20.5	03090910
7.26.4	03090911
9.8.2	03090912

ПРИМЕР II:

Определение констант аффинности (K_d) полноразмерных моноклональных антител человека против MAdCAM посредством BIAcore

[0283] Авторы изобретения провели определение аффинности очищенных антител посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием устройства BIAcore 3000 в соответствии с протоколами изготовителя.

Протокол 1

[0284] Для проведения кинетического анализа получали поверхность с высокой плотностью антитела мыши против антител человека (IgG_2 и IgG_4) на сенсорном чипе CM5 BIAcore с использованием стандартного присоединения аминов. Супернатанты гибридом разбавляли в 10, 5, 2 раза в подвижном буфере HBS-P (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% поверхностно-активное вещество P20), содержащем 100 мкг/мл BSA и 10 мг/мл карбоксиметилдекстрана или использованном в чистом виде. Каждое mAb улавливали на отдельной поверхности с использованием времени контакта 1 мин и промывания в течение 5 мин для стабилизации исходного уровня mAb. Затем инжестировали слитый белок MAdCAM-Fc IgG_1 (141 нМ) по всей поверхности в течение одной минуты, а затем проводили диссоциацию в течение 3 мин. Данные приводили к количеству антитела, уловленного на каждой поверхности, и оценивали с использованием глобальной аппроксимации Ленгмюра 1:1 с использованием моделей дрейфа нулевой линии, доступной в программном обеспечении BIAevaluation от BIAcore.

Протокол 2

[0285] Подвергнутое аффинной очистке mAb иммобилизовывали на декстрановом слое биосенсорного чипа CM5 с использованием присоединения аминов. Чипы получали с использованием ацетатного буфера pH 4,5 в качестве буфера для иммобилизации, и достигали плотности белка 2,5-5,5 kRU. Образцы слитого белка MAdCAM-Fc IgG_1 в подвижном буфере приготавливали в концентрациях в диапазоне 0,2-55 нМ (в качестве нулевого эталона использовали 0 нМ раствор, содержащий подвижный буфер отдельно). Образцы распределяли случайным образом в двух экземплярах в течение 3 мин в 4 проточных ячейки с использованием HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% поверхностно-активного вещества P20) в качестве подвижного буфера. Для минимизации ограничений переноса, связанных с массой, использовали 100 мкл/мин. Мониторинг диссоциации слитого белка MAdCAM-Fc IgG_1 проводили в течение 180 минут, регенерацию поверхности проводили посредством инжестирования в течение 6 с 25 mM H_3PO_4 (50 мкл/мин) или 10 mM (6.22.2), от 20 mM (6.67.1, 6.73.2, 6.77.1) до 25 mM (6.34.2) и 45 mM NaOH (6.14.2), и данные анализировали с использованием пакета программ BIAevaluation (v3.1).

[0286] В таблице 5 приведены результаты определения аффинности для репрезентативных антител против MAdCAM по настоящему изобретению:

Таблица 5. Определение константы аффинности, K_d , посредством поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore)

КЛОН	Протокол 1	Протокол 2
------	------------	------------

	k_{on} (1/M c)	k_{off} (1/c)	KD (пМ)	k_{on} (1/M c)	k_{off} (1/c)	KD (пМ)
1.7.2	$2,4 \times 10^5$	1×10^{-5}	42	$5,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^{-7}$	23,6
1.8.2	$2,9 \times 10^5$	1×10^{-5}	35	$1,8 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-5}$	128
7.16.6	$1,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-6}$	1,5	$2,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-6}$	4,8
7.20.5	$4,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-5}$	42,2	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-5}$	75
7.26.4	$9,6 \times 10^5$	$2,6 \times 10^{-4}$	271	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-5}$	80
6.14.2	$1,3 \times 10^5$	1×10^{-5}	7,7	5×10^5	$< 5 \times 10^{-6}$	< 10
6.22.2	$1,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-5}$	9,3	$2,3 \times 10^5$	$8,7 \times 10^{-7}$	3,8
6.34.2	$1,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{-5}$	15,8	$3,3 \times 10^5$	$< 5 \times 10^{-6}$	< 15
6.67.1	$5,9 \times 10^5$	1×10^{-5}	17	$2,4 \times 10^5$	$< 5 \times 10^{-6}$	< 20
6.73.2	$1,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{-4}$	93			
6.77.1	$1,5 \times 10^5$	1×10^{-5}	6,7			
9.8.2	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-4}$	100	$4,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-5}$	32,5

[0287] Анализ кинетики указывает на то, что антитела, полученные в соответствии с изобретением, обладают высокой аффинностью и сильными константами связывания в отношении внеклеточного домена MAdCAM.

ПРИМЕР III:

Идентификация селективности в отношении эпитопа и видовой перекрестной реактивности mAb против MAdCAM

[0288] Антитела распознают экспонированные на поверхности эпитопы на антигенах в качестве областей линейной (первичной) последовательности или структурной (вторичной) последовательности. Сортировку эпитопов Luminex, сортировку ВІАсорс и видовой иммуногистохимический анализ использовали совместно для определения функционального ландшафта эпитопов антитела против MAdCAM.

Сортировка эпитопов на основе Luminex:

[0289] Конъюгированные с MxhlgG 2.3.4 гранулы (Calbiochem Мл 1427) связывали с первичным неизвестным антителом против MAdCAM. Авторы изобретения добавляли 150 мкл разведения первичного неизвестного антитела (0,1 мкг/мл в среде для гибридомы) в лунку 96-луночного планшета для культивирования тканей. Исходный набор гранул осторожно встряхивали и разбавляли в супернатанте до концентрации $0,5 \times 10^5$ гранул/мл. Гранулы инкубировали в супернатанте на устройстве для встряхивания в течение ночи в темноте при 4°C.

[0290] Каждую лунку 96-луночного фильтровального микропланшета для титрования (Millipore # MABVN1250) предварительно смачивали добавлением 200 мкл промывочного буфера (PBS, содержащий 0,05% Tween20) и удаляли аспиратором. Далее к фильтровальному планшету добавляли 50 мкл/лунка $0,5 \times 10^5$ гранул/мл исходного раствора добавляли к фильтровальному планшету и лунки промывали промывочным буфером (2×100 мкл/лунка). Добавляли 60 мкл/лунка антигена MAdCAM-Fc IgG₁,

разбавленного в среде для гибридомы (0,1 мкг/мл). Планшеты накрывали и инкубировали при комнатной температуре при осторожном встряхивании в течение одного часа. Лунки промывали два раза путем добавления 100 мкл/лунка промывочного буфера с последующим аспирированием. Далее добавляли 60 мкл/лунка вторичного неизвестного антитела против MAdCAM, разбавленного в среде для гибридомы (0,1 мкг/мл). Планшеты встряхивали при комнатной температуре в темноте в течение двух часов. Далее лунки промывали два раза добавлением 100 мкл/лунка промывочного буфера с последующим аспирированием. Далее добавляли 60 мкл/лунка биотинилированного MxhIgG 2.3.4 (0,5 мкг/мл). Планшеты встряхивали при комнатной температуре в темноте в течение одного часа. Лунки промывали два раза добавлением 100 мкл/лунка промывочного буфера с последующим аспирированием. В каждую лунку добавляли 60 мкл 1 мкг/мл MxhIgG 2.3.4 стрептавидина-PE (Pharmacia #554061), разбавленного в среде для гибридомы. Планшеты встряхивали при комнатной температуре в темноте в течение двадцати минут. Лунки промывали два раза добавлением 100 мкл/лунка промывочного буфера с последующим аспирированием. Далее каждую лунку ресуспендировали в 80 мкл блокирующего буфера (PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином, 0,1% TWEEN и 0,01% тимеросалом), осторожно пипетировали вверх и вниз для ресуспендирования гранул.

[0291] С использованием Luminox 100 и прилагаемого к нему программного обеспечения (Luminox® Corporation) проводили считывание планшетов для определения данных люминесценции. Исходя из данных люминесценции, полученных для различных протестированных антител против MAdCAM, антитела против MAdCAM группировали в соответствии с их специфичностью связывания. Антитела против MAdCAM, которые тестировали, распределяли в зависимости от групп эпитопов, приведенных в таблице 8.

Сортировка с использованием BIAcore:

[0292] В способе, сходном со способом, описанным выше BIAcore также можно использовать для определения исключительности эпитопов антител против MAdCAM, проиллюстрированных в настоящем описании. Девять клонов антител против MAdCAM: 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1, 7.20.5, 9.8.2, 1.7.2, 7.26.4 и 7.16.6, иммобилизовывали на декстрановый слой отдельных проточных ячеек биосенсорного чипа CM5 с использованием присоединения аминов. Буфер для иммобилизации представлял собой либо 10 mM ацетатный буфер pH 4,5 (клоны 6.22.2, 6.34.2, 7.20.5, 9.8.2, 1.7.2, 7.26.4 и 7.16.6), либо 10 mM ацетатный буфер pH 5,5 (клоны 6.67.1 и 6.77.1). Во всех случаях достигали плотности белка приблизительно 3750 RU. Инактивацию не вступивших в реакцию N-гидроксисукцинимидных сложных эфиров проводили с использованием 1 M этаноламина гидрохлорида, pH 8,5.

[0293] Слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁ разбавляли до концентрации 1,5 мкг/мл (приблизительно 25 nM) в подвижном буфере HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% полисорбат 20). Затем его инжестировали в первую проточную ячейку в объеме 50 мкл при скорости потока 5 мкл/мин. После завершения инжестирования в ту же проточную ячейку добавляли первое антитело-зонд. Все

исследуемые антитела разбавляли до концентрации приблизительно 20 мкг/мл в HBS-EP, и также инжестировали в объеме 50 мкл при скорости потока 5 мкл/мин. Когда не наблюдали связывания исследуемого антитела сразу после этого добавляли следующий исследуемый клон. Когда связывание происходило, поверхность сенсора регенерировали для удаления как слитого белка MAdCAM-Fc IgG₁, так и исследуемого антитела. Использовали различные регенерирующие растворы в зависимости от присутствующего иммобилизованного антитела и исследуемого антитела. Обобщение использованных условий регенерации приведено в таблице 6.

Таблица 6. Обобщение условий регенерации, использованных для проведения картирования эпитопов BIAcore

Иммобилизованное антитело	Антитело-зонд, подлежащее удалению	Регенерирующий раствор	Инжеструемый объем
7.16.6	6.22.2	40 mM Фосфорная кислота	20 мкл
	6.34.2	40 mM Фосфорная кислота	40 мкл
	7.20.5	40 mM Фосфорная кислота	20 мкл
6.77.1	9.8.2	40 mM Фосфорная кислота	10 мкл
	1.7.2	40 mM Фосфорная кислота	5 мкл
	7.16.6	40 mM Фосфорная кислота	10 мкл
1.7.2	6.77.1	25 mM Фосфорная кислота	5 мкл
	9.8.2	25 mM Фосфорная кислота	5 мкл
	7.20.5	25 mM Фосфорная кислота	5 мкл
	6.22.2	25 mM Фосфорная кислота	5 мкл
	6.34.2	25 mM Натрий Гидроксид	5 мкл

	6.67.1	25 мМ Натрий Гидроксид	5 мкл
6.22.2	9.8.2	25 мМ Натрий Гидроксид	20 мкл
	7.26.4	25 мМ Натрий Гидроксид	5 мкл
6.34.2	9.8.2	25 мМ Натрий Гидроксид	70 мкл
	1.7.2	40 мМ Натрий Гидроксид	5 мкл
	7.26.4	40 мМ Натрий Гидроксид	5 мкл
6.67.1	9.8.2	40 мМ Натрий Гидроксид	5 мкл
	1.7.2	40 мМ Натрий Гидроксид	5 мкл
7.20.5	9.8.2	25 мМ Фосфорная кислота	5 мкл
	1.7.2	25 мМ Фосфорная кислота	5 мкл
	7.26.4	25 мМ Фосфорная кислота	5 мкл
7.26.4	9.8.2	40 мМ Натрий Гидроксид	20 мкл
	6.22.2	75 мМ Фосфорная кислота	20 мкл
	7.20.5	75 мМ Фосфорная кислота	20 мкл
	7.16.6	75 мМ Фосфорная кислота	20 мкл
9.8.2	9.8.2	25 мМ Фосфорная кислота	15 мкл
	6.22.2	25 мМ Фосфорная кислота	10 мкл

	7.20.5	25 mM Фосфорная кислота	20 мкл
	7.16.6	25 mM Фосфорная кислота	10 мкл

(В ходе всех процедур регенерации скорость потока составила 50 мкл/мин)

[0294] После регенерации слитый белок MAdCAM-Fc IgG₁ вновь связывали и далее инжестировали исследуемые антитела. Эти методики проводили до тех пор, пока вся панель клонов не была инжестирована на поверхности иммобилизованного антитела со связанным белком MAdCAM-Fc IgG₁. Затем новую проточную ячейку с отличающимся иммобилизованным антителом и связанным MAdCAM использовали для исследования с девятью исследуемыми клонами. Ожидалось, что антитела против MAdCAM 1.7.2 и 1.8.2 распознают один и тот же эпитоп MAdCAM, исходя из высокой гомологии первичных аминокислотных последовательностей их тяжелой цепи и легкой цепи каппа SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, соответственно. Таким образом, только 1.7.2 оценивали с использованием матрицы ответа BIAcore. Антитела 6.14.2 и 6.73.2 были исключены из этого анализа, но все другие комбинации пар антител против MAdCAM тестировали этим образом. Произвольный уровень 100 RU был выбран в качестве порога между связыванием/отсутствием связывания, и оценочную матрицу (таблица 7) создавали на основе того, наблюдалось ли связывание.

Таблица 7. Матрица ответа сортировки эпитопов BIAcore

Иммобилизованное антитело	Вторичное антитело								
	6.22.2	6.34.2	6.67.1	6.77.1	7.20.5	9.8.2	1.7.2	7.26.4	7.16.6
6.22.2	-	-	-	-	-	x	x	x	x
6.34.2	-	-	-	-	-	x	x	x	x
6.67.1	-	-	-	-	-	x	x	-	-
6.77.1	-	-	-	-	-	x	x	-	x
7.20.5	-	-	-	-	-	x	x	x	x
9.8.2	x	x	x	x	x	x	-	-	x
1.7.2	x	x	x	x	x	x	-	-	x
7.26.4	x	x	-	-	x	x	-	-	x
7.16.6	x	x	-	-	x	-	-	-	x

Матрица ответа для всех комбинаций пар антител. - указывает на отсутствие связывания антитела-зонда, x указывает на то, что связывание наблюдалось (выше выбранного порогового уровня 100 RU).

[0295] Диагональ матрицы в таблице 7 (затененная серым цветом) содержит данные о связывании для идентичных пар зондов. Во всех случаях, за исключением двух

клонов, 7.16.6 и 9.8.2, антитела были самоблокирующимися. Антитела 7.16.6 и 9.8.2 не обладают перекрестной конкуренцией. Отсутствие самоблокирования может быть следствием индуцированного mAb конформационного изменения слитого белка, которое позволяет дополнительное связывание mAb со вторым участком на MAdCAM-IgFc. Группирование клонов, которые демонстрируют одинаковый паттерн реактивности, дает начало по меньшей мере шести различным группам эпитопов, как показано на графическом представлении, фиг.5).

[0296] Кроме того, точная идентификация последовательностей эпитопов MAdCAM, с которыми взаимодействует антитело против MAdCAM, может быть проведена любым из ряда способов, включая, но не ограничиваясь ими, вестерн-анализ точечных матриц библиотеки пептидов (Reineke et al., Curr. Topics in Microbiol. and Immunol 243: 23-36 (1999), M. Famulok, E-L Winnacker, C-H Wong eds., Springer-Verlag, Berlin), фаговый дисплей или дисплей библиотеки экспрессии бактериального флагеллина/fliC, или простой анализ MALDI-TOF связанных фрагментов белков после ограниченного протеолиза.

Иммуногистохимический анализ:

[0297] Залитые ОСТ или сахарозой замороженные образцы тканей (пейеровы бляшки), мезентерического лимфатического узла, селезенки, желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки и ободочной кишки использовали в качестве положительных контролей окрашивания для mAb против MAdCAM. Для окрашивания срезов тканей человека посредством IgG₂-mAb получали биотинилированные производные mAb против MAdCAM. 10-мкм замороженные срезы тканей нарезали и помещали на предметные стекла, покрытые поли L-лизином, помещали непосредственно в 100% ацетон при 4°C (10 мин), затем 3% пероксид водорода в метаноле (10 мин), промывая между стадиями посредством PBS. Предметные системы блокировали посредством Biotin Blocking System (DAKO, каталожный номер № X0590), а затем инкубировали с первичным антителом (1:100-1:1000) в PBS (1 ч), промывали PBS-Tween 20 (0,05%), а затем связывание проявляли с использованием HRP-стрептавидина (BD Bioscience, каталожный номер №550946, 30 мин) и субстрата DAB (Sigma, каталожный номер № D5905). Для IgG₄-mAb использовали вторичное конъюгированное с HRP антитело мыши против IgG₄ человека (Zymed, каталожный номер № 3840). Предметные стекла подвергали контрастному окрашиванию с использованием Mayer's Haemalum (1 мин), промывали, а затем заливали DPX.

[0298] Аффинность связывания сравнивали для ряда видов (ткани мыши, крысы, кролика, собаки, свиньи, яванского макака и человека). Отсутствовала реактивность в отношении тканей крысы, кролика и свиньи при иммуногистохимии и отсутствовала перекрестная реактивность антител против MAdCAM в отношении рекомбинантного MAdCAM мыши при анализе посредством ELISA. Данные для тканей человека, яванского макака и собаки представлены в табличной форме в таблице 8 ниже:

Таблица 8. Профиль перекрестной реактивности антител против MAdCAM в

отношении видовых ортологов MAdCAM

		Перекрестная реактивность согласно ИНС			
КЛОН	Группа согласно Luminex	Человек	Яванский макак	Мартышка	Собака
		Подвздошная кишка	Подвздошная кишка	Подвздошная кишка	Подвздошная кишка
1.7.2	3a			n.d	
1.8.2	3a			n.d	
7.16.6	3b			n.d	
7.20.5	2b			n.d	
7.26.4	3b			n.d	
6.14.2	2			n.d	
6.22.2	2			n.d	
6.34.2	6			n.d	
6.67.1	5				
6.73.2	3			n.d	
6.77.1	1				
9.8.2	3a			n.d	
IgG2		Отсутствие связывания			
IgG4					
n.d. не определено					

[0299] Связывание антитела против MAdCAM со специализированными эндотелиальными структурами и лимфоидной тканью указано затенением в соответствии с ключом. Группа эпитопов на основе анализа эпитопов Luminex и паттерн перекрестной реактивности MAdCAM указаны для каждого антитела. Данные сортировки эпитопов Luminex для антител против MAdCAM 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.3 и 6.77.1 (курсив) были получены в отдельных экспериментах от 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 и 9.8.2 (полужирный шрифт), как указано отличием шрифта.

[0300] Все протестированные антитела против MAdCAM обладали способностью распознавать эпитоп MAdCAM человека, экспрессируемый на различных эндотелиальных компартментах желудочно-кишечного тракта. Помимо 1.7.2 и 1.8.2 все другие протестированные антитела против MAdCAM были способны специфически связываться с сосудисто-эндотелиальными компартментами желудочно-кишечного тракта яванского макака. Определенные другие антитела против MAdCAM, а именно, 6.14.2 и 6.67.1, также обладали способностью специфически распознавать ортолог MAdCAM собаки, а также MAdCAM яванского макака.

Получение функционально активной клеточной линии СНО, экспрессирующей

MAdCAM яванского макака/человека:

[0301] Отличия аффинности связывания определенных антител против MAdCAM с MAdCAM человека и яванского макака привели к желанию авторов изобретения определить, может ли быть получена структурная основа для этого наблюдения.

[0302] Исходя из опубликованной аминокислотной последовательности для MAdCAM макака (Shyjan AM, et al., J Immunol., 156, 2851-7 (1996)), конструировали праймеры для амплификации способом ПЦР последовательности связывающего домена $\alpha_4\beta_7$ MAdCAM яванского макака. Тотальную РНК получали из замороженного мезентериального лимфоузла яванского макака (приблизительно 200 мг) с использованием способа с Trizol (Invitrogen) в соответствии с инструкциями изготовителя. К 1-2 мкг добавляли олиго-dT праймер и проводили их транскрипцию с использованием обратной транскриптазы AMV (Promega). Часть обратно транскрибированного продукта подвергали ПЦР с прямым праймером 5'-AGC ATG GAT CGG GGC CTG GCC-3' (SEQ ID NO: 67) и обратным праймером 5'-GTG CAG GAC CGG GAT GGC CTG-3' (SEQ ID NO: 68) с полимеразой GC-2 в 1 М GC-melt (Clontech) и при температуре отжига 62°C. Продукт ОТ-ПЦР надлежащего размера вырезали и очищали из 1% агарозного геля после электрофореза, затем клонировали с использованием ТОРО-ТА (Invitrogen) между участками EcoRI pCR2.1. Последовательность вставки подтверждали секвенированием. Нуклеотидные и спрогнозированные транслированные аминокислотные последовательности представлены в SEQ ID NO: 49 и 50, соответственно.

[0303] Спрогнозированные аминокислотные последовательности MAdCAM человека и яванского макака для связывающего домена $\alpha_4\beta_7$ демонстрируют высокую степень идентичности последовательности (90,8%) при выравнивании (на фиг.3 представлено это выравнивание последовательностей). Для получения клеточной линии, экспрессирующей функционально активный MAdCAM яванского макака, который имитировал профиль связывания антитела против MAdCAM, представленный в таблице 8, фрагмент SacI, соответствующий последовательности связывающего домена $\alpha_4\beta_7$ яванского макака в pCR2.1, субклонировали непосредственно в С-концевую конструкцию pIND-Hygro с MAdCAM человека, содержащую С-концевой муциновый домен стебля и трансмембранный домен, описанный выше. Последовательность и ориентацию подтверждали, затем фрагмент KpnI/NotI клонировали в вектор pEF5FRTV5GWCAT (Invitrogen), заменяя кодирующую последовательность CAT, и использовали в трансфекции для получения единичных стабильно экспрессирующих клонов в клетках Flp In CHO (Invitrogen), в соответствии с инструкциями изготовителя.

[0304] Связывание клонов антител против MAdCAM с клетками CHO, экспрессирующими химеру MAdCAM яванского макака/человека, оценивали посредством проточной цитометрии и функциональную активность антител против MAdCAM определяли с использованием анализа клеточной адгезии JY, в высокой степени сходного с анализом, описанным выше. Связывание и функциональная активность антител против MAdCAM представлены в таблице 9.

[0305] Таблица 9. Корреляция между функциональной активностью в анализе адгезии MAdCAM яванского макака/человека-СНО/JY и анализах связывания MAdCAM человека и яванского макака/человека с клетками СНО при определении посредством FACS для ряда антител против MAdCAM.

КЛОН	Функцио-нальная IC ₅₀ (мкг/мл)	Связывание согласно FACS	
		Человек	Яванский макак/ человек
1.7.2	Неактивно		
1.8.2	Неактивно		
7.16.6	0,72		
7.20.5	0,62		
7.26.4	0,96		
6.14.2	0,53		
6.22.2	0,83		
6.34.2	0,47		
6.67.1	0,75		
6.73.2	Неактивно		
6.77.1	0,64		
9.8.2	0,83		
IgG2		Отсутствие связывания	
IgG4		Связывание	
		n.d. не определено	

[0306] В совокупности, существует хорошая корреляция между способностью данного антитела против MAdCAM связывать MAdCAM человека или яванского макака при определении посредством иммуногистохимии (таблица 8) со связыванием на основе рекомбинантных клеток и функциональной активностью (таблица 9). Антитела против MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 и 6.73.2, например, продемонстрировали постоянное отсутствие связывания с тканью яванского макака и клетками, экспрессирующими химерный белок MAdCAM яванского макака/человека. Антитела против MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 и 6.73.2 также не обладали способностью выявлять функциональную активность блокирования в анализе адгезии MAdCAM/JY яванского макака/человека.

[0307] Сходные подходы можно было использовать для определения эпитопа антител против MAdCAM 6.14.2 и 6.67.1, которые распознают MAdCAM собаки.

ПРИМЕР IV:

Применение mAb против MAdCAM для детекции циркулирующего растворимого MAdCAM в качестве способа диагностики заболевания

[0308] Антитела против MAdCAM можно использовать для детекции циркулирующего растворимого MAdCAM (sMAdCAM). Детекция sMAdCAM в клинических образцах плазмы, сыворотки или других биологических жидкостей, таких как, но не ограничиваясь ими, кал, моча, мокрота, вероятно, будет полезным суррогатным биомаркером для основного заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, воспалительное заболевание кишечника.

[0309] Исходя из данных сортировки эпитопов (таблицы 7 и 8), антитела против MAdCAM 1.7.2 и 7.16.6, по-видимому, распознают различные эпитопы на MAdCAM человека. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночи при 4°C посредством 100 мкл/лунка раствора 50 мкг/мл 1.7.2 в фосфатно-солевом буфере (PBS). После инкубации планшет блокировали в течение 1,5 часа посредством блокирующего буфера PBS, содержавшего 10% молоко (200 мкл/лунка). После инкубации планшет промывали PBS (2×100 мкл/лунка) и в планшет добавляли серийные разведения белка MAdCAM-Fc-IgG₁ от максимальной концентрации 50 мкг/мл до приблизительно 5 нг/мл в PBS до конечного объема 100 мкл для инкубации в течение 2 часов при комнатной температуре. В сходном подходе белок MAdCAM-Fc-IgG₁ можно разбавлять в плазме или сыворотке или некоторой другой такой подходящей биологической жидкости, и использовать для определения экспрессии растворимого MAdCAM в клиническом образце, как описано ниже. В качестве отрицательного контроля только буфер добавляли в лунки, содержавшие первичное антитело против MAdCAM. После этого планшет промывали PBS (3×100 мкл/лунка), а затем планшет инкубировали в темноте с меченым Alexa488 7.16.6 (100 мкл, 5 мкг /мл). Меченный Alexa488 7.16.6 получали с использованием коммерчески доступного набора (Molecular Probes, A-20181) в соответствии с протоколами изготовителя.

[0310] Планшет промывали PBS, содержавшим 0,05% Tween-20, и определяли связывание меченого 7.16.6 с уловленным растворимым MAdCAM путем определения флуоресценции (Wallac Victor2 1420 Multilabel Reader (λ возбуждения 485 нм, λ испускания 535 нм, подсчет сверху, 3 мм от дна планшета, в течение 0,1 с нормальной апертурой испускания)). После нанесения флуоресценции на график в качестве функции концентрации слитого белка MAdCAM-Fc-IgG₁, фиг.6, она показала, что 1.7.2 и меченое 7.16.6 можно использовать для диагностических целей для определения уровня циркулирующего растворимого MAdCAM, экспрессируемого в биологической жидкости или в клиническом образце. Этот подход сэндвич-ELISA не ограничивается использованием 1.7.2 и 7.16.6, а можно использовать любую комбинацию антител против MAdCAM, которые распознают отличающиеся эпитопы на MAdCAM, на что указывают данные и интерпретация в таблице 7 и на фиг.5. Сходные стратегии можно применять для разработки сходных способов анализа, таких как иммуногистохимия и вестерн-блоттинг, с другими описанными антителами против MAdCAM, с использованием отличающихся партнеров, вариантов, меток и т.д.

ПРИМЕР V:

Аминокислотная структура mAb против MAdCAM, полученных в соответствии с изобретением

[0311] В обсуждении ниже предоставлена структурная информация, касающаяся mAb против MAdCAM, полученных в соответствии с изобретением.

[0312] Для анализа структур mAb, полученных в соответствии с изобретением, авторы изобретения клонировали гены, кодирующие фрагменты тяжелых и легких цепей, из специфического клона гибридомы. Клонирование и секвенирование генов проводили следующим образом:

[0313] мРНК поли(А)⁺ выделяли приблизительно из 2×10^5 гибридных клеток, полученных от иммунизированных мышей XenoMouse с использованием набора Fast-Track (Invitrogen). За образованием кДНК со случайными праймерами наблюдали посредством ПЦР. Использовали праймеры, специфичные к семейству VH или Vκ человека (Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes"; Eur. J. Immunol., 21, 985-991 (1991)) или универсального праймера для VH, MG-30 (5'-CAG GTG CAG CTG GAG CAG TCI GG-3' (SEQ ID NO: 108) совместно с праймерами, специфичными к Cγ2 человека, MG40-d (5'-GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA-3') (SEQ ID NO: 109) или константной области Cγ4, MG-40d (5'-GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA CTG T-3') (SEQ ID NO: 110), или константной области Cκ (hκP2; как описано ранее в Green et al., 1994). Последовательности транскриптов происходящих из mAb человека тяжелой цепи и легкой цепи каппа из гибридом получали путем прямого секвенирования продуктов ПЦР, полученных из РНК поли(А⁺) с использованием праймеров, описанных выше. Продукты ПЦР клонировали в pCR2.1 с использованием набора для клонирования TOPO-TA (Invitrogen) и обе цепи секвенировали с использованием наборов для секвенирования Prism dye terminator sequencing kit и устройства для секвенирования ABI 377. Все последовательности анализировали посредством выравнивания с "V BASE sequence directory" (Tomlinson, et al, J. Mol. Biol., 227, 776-798 (1992); Hum. Mol. Genet., 3, 853-860 (1994); EMBO J., 14, 4628-4638 (1995)).

[0314] Кроме того, каждое из антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod подвергали полноразмерному секвенированию ДНК. Для этого тотальную РНК выделяли приблизительно из $3-6 \times 10^6$ гибридных клеток с использованием набора RNeasy (Qiagen). мРНК подвергали обратной транскрипции с использованием олиго-dT и системы обратной транскриптазы на основе AMV (Promega). V BASE использовали для конструирования 5'-специфических праймеров для амплификации, содержавших оптимальную последовательность Kozak и иницирующий кодон ATG (подчеркнут) и 3'-обратных праймеров для конкретных тяжелых цепей и цепей каппа, как представлено в таблице 10.

Таблица 10: Пары праймеров для ПЦР для амплификации кДНК из экспрессирующих mAb MAdCAM гибридом и праймеры, использованные для

конструирования модифицированных версий антител против MAdCAM.

	Последовательность олигонуклеотида
VH1-18	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGC ATCCTT 3' (SEQ ID NO:70)
VH3-15	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC TGGATT 3' (SEQ ID NO: 71)
VH3-21	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAACTGGGGCTCCGC TGGGTT 3' (SEQ ID NO: 72)
VH3-23	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC TGGCTT 3' (SEQ ID NO: 73)
VH3-30	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC TGGGTT 3' (SEQ ID NO: 74)
VH3-33	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC TGGGTT 3' (SEQ ID NO: 75)
VH4-4	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAACACCTGTGGTTC TTCCTC 3' (SEQ ID NO: 76)
A2/A3	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGAGGCTCCCTGCTCAG CTCCTG 3' (SEQ ID NO: 77)
A26	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGTTGCCATCACAACTC ATTGGG 3' (SEQ ID NO: 78)
B3	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGTGTTCAGACCCAG GTCTTC 3' (SEQ ID NO: 79)
O12	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCC

	GCTCAG 3' (SEQ ID NO: 80)
O18	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCT GCTCAG 3' (SEQ ID NO: 81)
RevIgG2 RevIgG4 RevKappa	5' TTCTCTGATCAGAATTCCTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG 3' (SEQ ID NO: 82) 5' TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC 3' (SEQ ID NO: 83) 5' TTCTCTGATCAGAATTCCTATCATTTACCCAGAGACAGGGAGAG 3' (SEQ ID NO: 84)
6.22.2VK_F1 6.22.2VK_R1 6.22.2VH_F1 6.22.2VH_R1 6.22.2VH_CS*	5'-GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GC-3'(SEQ ID NO: 85) 5'-GCT TCC AGG CTA TTG ATG GTG AGG GTG AAA TCT GTC CCA GAT CC-3'(SEQ ID NO: 86) 5'-GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC-3'(SEQ ID NO: 87) 5'-GCT ACT GAA GGT GAA TCC AGA CGC TGC-3'(SEQ ID NO: 88) 5'-CGG AGG TGC TTC TAG AGC AGG GCG-3'(SEQ ID NO: 89)
6.34.2VK_F1 6.34.2VK_R1 6.34.2VK_F2 6.34.2VK_R3 6.34.2VH_F16,3 4 .2VH_R1	5'-GCA AGT CAG AGT ATT AGT AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CC-3'(SEQ ID NO: 90) 5'-GGT TTC TGC TGA TAC CAA TTT AAA TAG CTA CTA ATA CTC TGA CTT GC-3'(SEQ ID NO: 91) 5'-CCA TCA GTT CTC TGC AAC CTG AGG ATT TTG CAA CTT ACT ACT GTC ACC-3'(SEQ ID NO: 92) 5'-GGT GAC AGT AGT AAG TTG CAA AAT CCT CAG GTT GCA GAG AAC TGA TGG-3'(SEQ ID NO: 93) 5'-GCA AAT GAA CAG CCT GCG CGC TGA GGA CAC G-3'(SEQ ID NO: 94) 5'-CGT GTC CTC AGC GCG CAG GCT GTT CAT TTG C-3'(SEQ ID NO: 95)
6.67.1VK_F1 6.67.1VK_R1 6.67.1VH_F1 6.67.1VH_R1 6.67.1VH_CS*	5'-CAA TAA GAA CTA CTT AGC TTG GTA CCA ACA GAA ACC AGG ACA GCC-3'(SEQ ID NO: 96) 5'-GGC TGT CCT GGT TTC TGT TGG TAC CAA GCT AAG TAG TTC TTA TTG-3'(SEQ ID NO: 97) 5'-CCC TCA GGG GTC GAG TCA CCA TGT CAG TAG ACA CGT CCA

	AGA ACC-3'(SEQ ID NO: 98) 5'-GGT TCT TGG ACG TGT CTA CTG ACA TGG TGA CTC GAC CCC TGA GGG-3'(SEQ ID NO: 99) 5'-ATT CTA GAG CAG GGC GCC AGG-3'(SEQ ID NO: 100)
6.77.1VK_F1 6.77.1VK_R1 6.77.1VK_F2 6.77.1VK_R2	5'-CCA TCT CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3'(SEQ ID NO: 101) 5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG AGA TGG-3'(SEQ ID NO: 102) 5'-GGT TTA TTA CTG CAT GCA AAG TAT ACA GCT TAT GTC CAG TTT TGG CC -3' (SEQ ID NO: 103) 5'-GGC CAA AAC TGG ACA TAA GCT GTA TAC TTT GCA TGC AGT AAT AAA CC -3'(SEQ ID NO: 104)
7.26.4K_F1	5'-CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3'(SEQ ID NO: 105)
7.26.4K_R1	5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG-3'(SEQ ID NO: 106)

[0315] Пары праймеров использовали для амплификации кДНК с использованием высокоточной Taq-полимеразы Expand High Fidelity Taq polymerase (Roche), и продукты ПЦР клонировали в pCR2.1 TOPO-TA (Invitrogen) для последующего секвенирования. Затем клоны с подтвержденной последовательность тяжелой цепи и легкой цепи каппа клонировали в векторы pEE6.1 и pEE12.1 (LONZA) с использованием участков XbaI/EcoRI и HindIII/EcoRI, соответственно.

Анализ использования генов

[0316] В таблице 11 представлено использование генов тяжелой цепи и легкой цепи каппа для каждой гибридомы, описанной в описании.

КЛОН	Тяжелая цепь			Легкая цепь каппа	
	VH	D	JH	Vк	Жк
1.7.2	VH3-15	D6-19	JH4b	A3	JK5
1.8.2	VH3-15	D6-19	JH4b	A3	JK5
7.16.6	VH1-18	D6-6	JH6b	A2	JK1
7.20.5	VH4-4	D3-10	JH6b	A3	JK4
7.26.4	VH1-18	D6-6	JH6b	A2	JK1
6.14.2	VH3-23	D5-5	JH4b	O12	JK5
6.22.2	VH3-33	D5-12	JH6b	A26	JK4
6.34.2	VH3-30	D4-23	JH6b	O12	JK3
6.67.1	VH4-4	D3-10	JH4b	B3	JK4
6.73.2	VH3-23	D6-19	JH6b	O12	JK2

6.77.1	VH3-21	D6-19	JH6b	A2	JK2
9.8.2	VH3-33	D3-10 или D3-16	JH4b	O18	JK5
IgG2					
IgG4					

Таблица 11: Использование генов тяжелой цепи и легкой цепи каппа

Анализ последовательности

[0317] Для дальнейшего исследования структуры получали прогнозируемые аминокислотные последовательности антител из кДНК, полученных из клонов.

[0318] Идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO:) 1-48 и 51-68 соответствуют нуклеотидным и аминокислотным последовательностям тяжелых цепей и легких цепей каппа антител против MAdCAM 1.7.2 (SEQ ID NO: 1-4), 1.8.2 (SEQ ID NO: 5-8), 6.14.2 (SEQ ID NO: 9-12), 6.22.2 (SEQ ID NO: 13-16), 6.34.2 (SEQ ID NO: 17-20), 6.67.1 (SEQ ID NO: 21-24), 6.73.2 (SEQ ID NO: 25-28), 6.77.1 (SEQ ID NO: 29-32), 7.16.6 (SEQ ID NO: 33-36), 7.20.5 (SEQ ID NO: 37-40), 7.26.4 (SEQ ID NO: 41-44), 9.8.2 (SEQ ID NO: 45-48) и модифицированных антител против MAdCAM 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 51-54), 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 55-58), 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 59-62) и 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 63-66) и 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 41-42, 67-68). Для каждой клонированной последовательности антитела против MAdCAM последовательности сигнального пептида (или оснований, кодирующих их) указаны строчными буквами и подчеркнуты.

[0319] На фиг.1A-1J представлено выравнивание последовательностей между спрогнозированными аминокислотными последовательностями антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 и 9.8.2 и аминокислотной последовательностью соответствующих продуктов эмбрионального типа. Положения последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 антител подчеркнуты, отличия между представленной последовательностью и соответствующей последовательностью эмбрионального типа указаны полужирным шрифтом и, когда присутствуют вставки в представленной последовательности по сравнению с последовательностью эмбрионального типа, они указаны как (-) в последовательности эмбрионального типа.

[0320] На фиг.1K-1T представлено выравнивание последовательностей между спрогнозированными аминокислотными последовательностями легкой цепи каппа антител 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 и 9.8.2 и аминокислотной последовательностью соответствующих продуктов генов эмбрионального типа. Положения последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 антител подчеркнуты, отличия между представленной последовательностью и соответствующей последовательностью эмбрионального типа указаны полужирным шрифтом и, когда присутствуют вставки в представленную последовательность по сравнению с последовательностью эмбрионального типа, они указаны как (-) в последовательности эмбрионального типа.

Наличие посттрансляционной модификации: гликозилирование и дезамидирование:

[0321] Эффект некоторых из изменений в представленной последовательности антитела против MAdCAM по сравнению с определенной последовательностью эмбрионального типа состоит во внесении остатков, которые потенциально могут быть подвергнуты N-связанному гликозилированию (Asn-X-Ser/Thr) и/или дезамидированию (Asn-Gly) (см. таблица 12). Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности переменного домена легкой цепи каппа антител против MAdCAM 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 и 9.8.2, (SEQ ID NO: 16, 20, 24, 28, 32, 44 и 48) и переменного домена тяжелой цепи антитела 6.14.2 (SEQ ID NO: 10), прогнозируют присутствие N-связанного гликозилирования. Присутствие посттрансляционной модификации исследовали с использованием комбинации SDS-PAGE и окрашивания Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein (Molecular Probes) с использованием mAb 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 и 9.8.2.

[0322] В кратком изложении, приблизительно 2 мкг восстановленного антитела против MAdCAM наносили на 4-12% SDS-полиакриламидный гель с использованием буфера MOPS. После электрофореза гель фиксировали в 50% MeOH, 5% уксусной кислоте и промывали 3% уксусной кислотой. Затем любые углеводы на геле окисляли периодной кислотой и окрашивали с использованием набора Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Stain Kit (Molecular Probes). После последней стадии промывания окрашивание гликопротеина визуализировали с использованием сканера флуоресценции, установленного на длину волны 473.

[0323] После окрашивания на гликопротеин гель окрашивали на общий белок с использованием красителя для белков в геле SYPRO Ruby и анализировали с использованием флуоресцентного сканера, установленного на длину волны 473 нм. Все легкие цепи каппа антител против MAdCAM 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 и 9.8.2 положительно окрашивались на наличие гликозилирования. В качестве дополнительного подтверждения антитело против MAdCAM 7.26.4 подвергали расщеплению трипсином/химотрипсином, анализ LC-MS/MS подтверждал присутствие модифицированного триптического пептида и обеспечивал дополнительное подтверждение гликозилирования легкой цепи каппа.

[0324] Специальные последовательности Asn-Gly в областях CDR1 антител против MAdCAM 1.7.2, 1.8.2, 6.22.2 и 7.20.5 делают эти области чувствительными к дезамидированию. Дезамидирование при нейтральных значениях pH вносит отрицательный заряд и также может приводить к β-изомеризации, которая может влиять на свойства антитела. Для антител против MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 и 7.20.5 присутствие дезамидированных остатков Asn-изоаспартат оценивали масс-спектроскопией с последующим улавливанием боковой изоаспартата с помощью MeOH.

[0325] В кратком изложении для антитело против MAdCAM 1.7.2 состояние триптический/Asp-N пептид SSQSLQSNQYNYL (SEQ ID NO: 69) (1573,7 Да) выбирали для мониторинга посредством LC-MS/MS. Антитело против MAdCAM 1.7.2 восстанавливали в 10 mM DTT, алкилировали в 5 mM йодацетате Na, а затем заменяли на

буфер для расщепления трипсином (50 мМ Tris- HCl, 1 мМ CaCl₂, pH 7,6). Затем антитело смешивали с модифицированным трипсином категории, подходящей для секвенирования (Promega) в соотношении протеаза:белок 1:20. Белок расщепляли в трипсине в течение 15 часов при 30°C, и полученные пептиды разделяли посредством ВЭЖХ с использованием C-18 RPC на системе Ettan LC. ³³Asn-содержащий пептид (4032 Да) собирали с колонки и разбавляли в буфере для отщепления Asp-N (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0). Затем добавляли эндопротеазу Asp-N (Roche) в приблизительном соотношении пептид:фермент 10:1.

[0326] Ацетилхлорид (100 мкл) добавляли к образцу метанола (1 мл, -20°C), смесь нагревали до комнатной температуры. Продукт расщепления триптический+Asp-N сушили в Speed-Vac, а затем добавляли 5 мкл метанола/ацетилхлорида (45 мин, комнатная температура), а затем вновь сушили в Speed-Vac. Полученный остаток повторно разбавляли в 0,1% TFA и пептиды анализировали сначала на масс-спектрометре MALDI-TOF Voyager-DE STR с использованием либо тонкослойного способа получения образца на нитроцеллюлозе, либо обращено-фазовой очистки с использованием C18 ZipTips (Millipore) с последующим капельным перемешиванием с использованием α-цианоматрицы. Смесь метилированных пептидов также анализировали с использованием LC-MS/MS на масс-спектрометре Deca XP Plus Ion Trap Mass Spectrometer, как описано выше. Элюат прямо загружали в Ion Trap MS, а затем пептиды анализировали посредством MS и MS/MS. MS была установлена для анализа всех ионов от 300 до 2000 Да. Затем наиболее сильный ион в каком-либо конкретном сканировании подвергали анализу MS/MS.

Таблица 12. Посттрансляционная модификация антител против MAdCAM

КЛОН	Тяжелая цепь		Легкая цепь каппа			
	Гликози- лирование (NXS/T)	Подтвер- ждено	Гликози- лирование (NXS/T)	Подтвер- ждено	Дезами- дирование	Подтвер- ждено
1.7.2	TFNNSAMT	N.D.			LQSNGYN	MS
1.8.2					LQSNGYN	MS
7.16.6						
7.20.5					HGNGYNY	MS
7.26.4			CKSNQSLLY	PAGE		
6.14.2						
6.22.2			SGTNFTLTI	PAGE	LTINGLEA	N.D.
6.34.2			ASQNISSYL	PAGE		
6.67.1			SSNNKTYLA	PAGE		
6.73.2			RASQNITN	PAGE		

6.77.1			SCNSSQSL	PAGE		
9.8.2			HSDNLSIT	PAGE		
IgG2						
IgG4						

Исследования мутагенеза:

[0327] Первичная аминокислотная последовательность антител против MAdCAM, проиллюстрированных в настоящем описании, может быть модифицирована сайт-направленным мутагенезом для удаления потенциальных участков посттрансляционной модификации (например, гликозилирование, дезамидирование) или для изменения исходного изотипа или для внесения других изменений, которые могут повышать терапевтическую применимость. В качестве примера ПЦР использовали для внесения изменений в антитела против MAdCAM 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 и 7.26.4, для обратного изменения определенных каркасных последовательностей на последовательности эмбрионального типа, для удаления потенциальных участков гликозилирования и/или для изменения исходного изотипа на IgG₂ человека. Клонированные с использованием pCR2.1 TOPO-TA кДНК (100 нг), соответствующие нуклеотидным последовательностям тяжелой цепи SEQ ID NO: 13, 17, 21 и 29, и нуклеотидны последовательностям легкой цепи каппа SEQ ID NO: 15, 19, 23, 31 и 43, использовали в качестве матрицы в серии ПЦР с удлинением внахлест и панели наборов праймеров, описанных в таблице 10.

[0328] Тяжелая цепь 6.22.2: Набор праймеров ПЦР 6.22.2_VH_F1 и 6.22.2VH_CS* (1) и VH3-33 и 6.22.2_VH_R1 (2) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1) и (2), с использованием Taq-полимеразы Expand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13. Продукты (1) и (2) очищали и комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами VH3-33 и VK6.22.2_CS* с получением модифицированного V-домена тяжелой цепи 6.22.2. Эта модифицированная версия содержит мутацию His/Phe в FR1 и вносит участок рестрикции XbaI для обеспечения клонирования в рамке считывания в вектор, происходящий из pEE6.1, называемый pEE6.1CH, который содержит соответствующий константный домен IgG₂ человека. Конечный фрагмент ПЦР клонировали в участок XbaI pEE6.1CH, проверяли в отношении ориентации и подтверждали вставку полной последовательности. Нуклеотидная последовательность для модифицированной тяжелой цепи 6.22.2 представлена в SEQ ID NO: 51 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 52. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0329] Легкая цепь каппа 6.22.2: Наборы праймеров ПЦР 6.22.2_VK_F1 и revKappa (1), и A26 и 6.22.2_VK_R1 (2) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1) и (2), с использованием Taq-полимеразы Expand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100

нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15. Продукты (1) и (2) очищали и комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами A26 и revКарра с получением модифицированного V-домена легкой цепи каппа 6.22.2. Эта модифицированная версия содержит изменения Asn/Asp и Gly/Ser в последовательности FR3. Конечный фрагмент ПЦР клонировали в pEE12.1 с использованием участков HindIII/EcoR1 и полностью проверяли последовательность. Нуклеотидная последовательность для модифицированной легкой цепи каппа 6.22.2 представлена в SEQ ID NO: 53 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 54. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0330] Тяжелая цепь 6.34.2: Наборы праймеров ПЦР 6.34.2_VH_F1 и 6.22.2VH_CS* (1) и VH3-30 и 6.34.2_VH_R1 (2) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1) и (2), с использованием Taq-полимеразы Exrand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17. Продукты (1) и (2) очищали и комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами VH3-30 и VK6.22.2_CS* с получением модифицированного V-домена тяжелой цепи 6.34.2. Эта модифицированная версия содержит мутацию Ser/Arg в FR3 и вносит участок рестрикции XbaI для обеспечения клонирования в рамке считывания в вектор, происходящий из pEE6.1, называемый pEE6.1CH, который содержит соответствующий константный домен IgG₂ человека. Конечный фрагмент ПЦР клонировали в участок XbaI pEE6.1CH, проверяли в отношении ориентации и подтверждали вставку полной последовательности. Нуклеотидная последовательность для модифицированной тяжелой цепи 6.34.2 представлена в SEQ ID NO: 55 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 56. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0331] Легкая цепь каппа 6.34.2: Наборы праймеров ПЦР O12 и 6.34.2_VK_R1 (1), 6.34.2_VK_F1 и 6.34.2_VK_R2 (2), а также 6.34.2_VK_F2 и revКарра (3) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1), (2) и (3), с использованием Taq-полимеразы Exrand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19. Продукты (1), (2) и (3) очищали и (1) и (2) комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами O12 и 6.34.2_VK_R2 с получением продукта ПЦР (4). Продукты ПЦР (2) и (3) комбинировали на четвертой стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого), вместе с 6.34.2_VK_F1 и revКарра, с получением продукта ПЦР (5). Продукты ПЦР (4) и (5) очищали и комбинировали вместе (приблизительно 50 нг каждого) с праймерами O12 и revКарра с получением модифицированного V-домена легкой цепи каппа 6.34.2. Эта модифицированная версия содержит замену Asn/Ser в CDR1, замену Phe/Tyr в FR2 и замены Arg-Thr/Ser-Ser, Asp/Glu и Ser/Tyr в последовательности FR3. Конечный фрагмент ПЦР клонировали в pEE12.1 с использованием участков HindIII/EcoR1 и полностью

проверяли последовательность. Нуклеотидная последовательность для модифицированной легкой цепи каппа 6.34.2 представлена в SEQ ID NO: 57 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 58. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0332] Тяжелая цепь 6.67.1: Наборы праймеров ПЦР 6.67.1_VH_F1 и 6.67.1VH_CS* (1) и VH4-4 и 6.67.1_VH_R1 (2) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1) и (2), с использованием Taq-полимеразы Expand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 21. Продукты (1) и (2) очищали и комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами VH4-4 и VK6.67.1_CS* с получением модифицированного V-домена тяжелой цепи 6.67.1. Эта модифицированная версия содержит конверсию Ile-Leu-Ala/Met-Ser-Val в FR3 и вносит участок рестрикции XbaI для обеспечения клонирования в рамке считывания в вектор, происходящий из pEE6.1, называемый pEE6.1CH, который содержит соответствующий константный домен IgG₂ человека. Конечный фрагмент ПЦР клонировали в участок XbaI pEE6.1CH, проверяли в отношении ориентации и подтверждали вставку полной последовательности. Нуклеотидная последовательность для модифицированной тяжелой цепи 6.67.1 представлена в SEQ ID NO: 59 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 60. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0333] Легкая цепь каппа 6.67.1: Наборы праймеров ПЦР 6.67.1_VK_F1 и revKappa (1), и B3 и 6.67.1_VK_R1 (2) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1) и (2), с использованием Taq-полимеразы Expand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 23. Продукты (1) и (2) очищали и комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами B3 и revKappa с получением модифицированного V-домена легкой цепи каппа 6.67.1. Эта модифицированная версия содержит замену Thr/Asn в CDR1 и замену Arg/Gly в FR2. Конечный фрагмент ПЦР клонировали в pEE12.1 с использованием участков HindIII/EcoRI и полностью проверяли последовательность. Нуклеотидная последовательность для модифицированной легкой цепи каппа 6.67.1 представлена в SEQ ID NO: 61 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 62. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0334] Тяжелая цепь 6.77.1: Наборы праймеров ПЦР VH 3-21 и 6.22.VH_CS*использовали для получения отдельного продукта ПЦР, с использованием Taq-полимеразы Expand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 29. Продукт ПЦР расщепляли XbaI, очищали на геле и клонировали в участок XbaI pEE6.1CH, проверяя ориентацию. Последовательность вставки полностью проверяли. Нуклеотидная последовательность для

модифицированной тяжелой цепи 6.77.1 представлена в SEQ ID NO: 63 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 64. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0335] Легкая цепь каппа 6.77.1: Наборы праймеров ПЦР A2 и 6.77.1_VK_R1 (1), 6.77.1_VK_VK_F1 и 6.77.1_R2 (2), а также 6.77.1_VK_F2 и revКарра (3) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1), (2) и (3), с использованием Taq-полимеразы Expand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 31. Продукты (1), (2) и (3) очищали и (1) и (2) комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами A2 и 6.77.1_VK_R2 с получением продукта ПЦР (4). Продукты ПЦР (2) и (3) комбинировали на четвертой стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого), вместе с 6.77.1_VK_F1 и revКарра, с получением продукта ПЦР (5). Продукты ПЦР (4) и (5) очищали и комбинировали вместе (приблизительно 50 нг каждого) с праймерами A2 и JK2 с получением модифицированного V-домена легкой цепи каппа 6.77.1. Эта модифицированная версия содержит замену Asn/Lys в CDR1, замену Ser/Туг в FR3 и замену остатков Cys/Ser в последовательности CDR3. Конечный продукт ПЦР клонировали в pEE12.1 с использованием участков HindIII/EcoR1 и полностью проверяли последовательность. Нуклеотидная последовательность для модифицированной легкой цепи каппа 6.77.1 представлена в SEQ ID NO: 65 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 66. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0336] Легкая цепь каппа 7.26.4: Наборы праймеров ПЦР 7.26.4_VK_F1 и revКарра (1), и A2 и 7.26.4_VK_R1 (2) использовали для получения отдельных продуктов ПЦР (1) и (2), с использованием Taq-полимеразы Expand и кДНК-матрицы pCR2.1 TOPO-TA (100 нг), соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 43. Продукты (1) и (2) очищали и комбинировали на третьей стадии ПЦР (приблизительно 50 нг каждого) вместе с праймерами A2 и revКарра с получением модифицированного V-домена легкой цепи каппа 7.26.4. Эта модифицированная версия содержит замену Asn/Ser в CDR1. Конечный продукт ПЦР клонировали в pEE12.1 с использованием участков HindIII/EcoR1 и полностью проверяли последовательность. Нуклеотидная последовательность для модифицированной легкой цепи каппа 7.26.4 представлена в SEQ ID NO: 67 и соответствующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 68. Указаны изменения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по сравнению с исходной последовательностью.

[0337] Функциональный эукариотический экспрессирующий вектор для каждой из модифицированных версий 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 и 7.26.4, упоминаемых как 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod, и соответствующих, соответственно, нуклеотидным последовательностям тяжелой цепи SEQ ID NO: 51, 55, 59, 63 и 41, и соответствующим аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 52, 56,

60, 64 и 42, а также нуклеотидным последовательностям легкой цепи каппа SEQ ID NO: 53, 57, 61, 65 и 67, и соответствующим аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 54, 58, 62, 66 и 68 собирали следующим образом: вставки кДНК тяжелой цепи, соответствующие 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod и 6.77.1-mod, вырезали из вектора pEE6.1CH с использованием NotI/SalI, исходные версии тяжелых цепей 7.26.4 вырезали из вектора pEE6.1 с использованием NotI/SalI и очищенные фрагменты клонировали в идентичные участки в соответствующем векторе pEE12.1, содержащем иодифицированные версии последовательностей легких цепей каппа 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod. Последовательности векторов подтверждали и очищенные количества использовали во временной трансфекции с клетками НЕК 293Т. В кратком изложении, 9×10^6 клеток НЕК 293Т, посеянных во флакон T165 за сутки до трансфекции и промытых Optimem, временно трансфицировали векторными кДНК, соответствующими 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod (40 мкг) с использованием Lipofectamine PLUS (Invitrogen) в соответствии с инструкциями изготовителя. Клетки инкубировали в течение 3 ч, затем среду для трансфекции заменяли средой DMEM (Invitrogen 21969-035), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку со сверхнизким содержанием IgG (Invitrogen 16250-078) и L-глутамин (50 мл). Супернатант среды собирали через 5 суток подвергали стерилизации фильтрованием и антитело против MAdCAM очищали с использованием аффинной хроматографии с белком G-сефарозой аналогично тому, как описано выше. Количество выделенного антитела (20-100 мкг) количественно определяли с использованием анализа Брэдфорд.

[0338] Активность против MAdCAM подвергнутого аффинной очистке антитела 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod оценивали в анализе слияния MAdCAM-Fc-IgG₁, как описано ранее. Величины IC₅₀ для этих антител против MAdCAM по сравнению с исходными антителами против MAdCAM, из которых они происходят, представлены в таблице 13. Существовал минимальный эффект аминокислотных замен, описанных выше, на активность модифицированных антител против MAdCAM по сравнению с их исходными антителами. Антитела также сохраняли их связывание с клетками СНО, экспрессирующими рекомбинантный MAdCAM человека или химеру MAdCAM яванский макак/человек.

Таблица 13. Активность модифицированных версий антител против MAdCAM 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod по сравнению с их исходными антителами.

КЛОН	Анализ слитой конструкции MAdCAM Fc IgG ₁ , средняя IC ₅₀ (мкг/мл)	
	Исходное	Модифицированное
6.22.2	0,018	0,058
6.34.2	0,013	0,049
6.67.1	0,013	0,037

6.77.1	0,022	0,077
7.26.4	0,021	0,033

ПРИМЕР VI

Увеличение уровня β_7^+ лимфоцитов в периферическом кровотоке посредством блокирующих антител против MAdCAM

[0339] Был разработан анализ для идентификации и сопоставления механистического эффекта антитела против MAdCAM и его циркулирующего уровня в крови. Ингибиторное антитело против MAdCAM должно иметь эффект ингибирования привлечения лейкоцитов, экспрессирующих интегрин $\alpha_4\beta_7$, в желудочно-кишечный тракт. Таким образом, классы лейкоцитов, имеющих интегрин $\alpha_4\beta_7$, должны ограничиваться периферическим кровотоком.

[0340] Это было продемонстрировано с помощью полностью человеческого mAb против MAdCAM человека 7.16.6, на яванском макаке.

[0341] Очищенное mAb против MAdCAM человека 7.16.6 (1 мг/кг) или носитель (20 mM ацетат Na, 0,2 мг/мл полисорбат 80, 45 мг/мл маннита и 0,02 мг/мл EDTA при pH 5,5) оценивали аналогичным образом путем внутривенного введения через подкожную вену двум группам яванских макак (n=4/группа). На 3 сутки после дозирования проводили взятие образцов крови в пробирки с EDTA посредством пункции бедренной вены. Специфичные к LРАМ антитела, которые перекрестно реагируют с интегрином $\alpha_4\beta_7$ яванского макака, не являются коммерчески доступными, так что вместо них использовали антитело против β_7 (распознающее интегрин $\alpha_4\beta_7$ и $\alpha_E\beta_7$). Антитела (30 мкл), в соответствии со следующей таблицей 15, добавляли в пробирки, содержавшие 100 мкл крови яванского макака, перемешивали посредством осторожного встряхивания и инкубировали в течение 20-30 мин при 4°C.

Таблица 15. Антитела (BD Pharmingen), использованные для иммунофенотипирования крови яванского макака

Каталожный номер	Антитело или изотип
555748	mIgG1, k-FITC
555844	mIgG2a, k-PE
559425	mIgG1 - PerCP
555751	mIgG1, k-APC
555728	CD 28-FITC
555945	β_7 -PE
558814	CD 95-APC
550631	CD 4-PerCP

[0342] В каждую пробирку добавляли 1 мл раствора FACSlyse 1:10 (BD # 349202), перемешивали путем осторожного встряхивания и инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 12 минут в темноте до тех пор, пока лизис

эритроцитов не завершался. Затем в каждую пробирку добавляли 2 мл буфера для окрашивания BD (# 554656), перемешивали и центрифугировали при $250 \times g$ в течение 6-7 мин при комнатной температуре. Супернатант декантировали и осадок ресуспендировали в 3 буфера для окрашивания, вновь перемешивали и центрифугировали при $250 \times g$ в течение 6-7 мин при комнатной температуре. К клеточному осадку периферической крови обезьяны добавляли буфер Cytotfix (BD # 554655), содержащий параформальдегид (100 мкл) и тщательно перемешивали с использованием низкой/умеренной скорости устройства для встряхивания. Образцы держали при 4°C в темноте, а затем получали данные с использованием FACSCalibur. Непосредственно перед получением данных во все пробирки непосредственно перед получением данных добавляли PBS (100 мкл). Абсолютные количества клеток $\text{CD4}^+\beta_7^+\text{CD95}^{\text{lo}}\text{CD28}^+$ (наивные), $\text{CD4}^+\beta_7^+\text{CD95}^{\text{hi}}\text{CD28}^+$ (центральные клетки памяти), $\text{CD4}^+\beta_7^-\text{CD95}^{\text{hi}}\text{CD28}^+$ (центральные клетки памяти), $\text{CD4}^+\beta_7^+\text{CD95}^{\text{hi}}\text{CD28}^-$ (эффекторные клетки памяти) определяли посредством соответствующего гейтирования и анализа квадрантов. Другие подгруппы Т-клеток, например, CD8^+ центральные Т-клетки памяти ($\beta_7^+\text{CD8}^+\text{CD28}^+\text{CD95}^+$) и любые другие лейкоциты, имеющие лиганд MAdCAM, также можно анализировать этим способом с соответствующими антителами. По сравнению с контролем в виде носителя mAb против MAdCAM 7.16.6 вызывало приблизительно 3-кратное изменение уровней циркулирующих $\text{CD4}^+\beta_7^+\text{CD95}^{\text{hi}}\text{CD28}^+$ центральных Т-клеток памяти, как показано на фиг.7. Отсутствовали эффекты на популяцию циркулирующих $\text{CD4}^+\beta_7^-\text{CD95}^{\text{hi}}\text{CD28}^+$ центральных Т-клеток памяти, что указывает на то, что эффект mAb против MAdCAM 7.16.6 является специфическим в отношении Т-клеток, обладающих хомингом в кишечнике. Эффекты mAb против MAdCAM 7.16.6 у яванского макака на популяции циркулирующих $(\alpha_4)\beta_7^+$ лимфоцитов указывает на то, что он является надежным заместительным объясняющим механизм биомаркером, в частности, в контексте практического применения в клинических условиях.

Последовательности

[0343] В SEQ ID NO: 1-48,51-68 и 148-150 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи каппа для тринадцати антител человека против MAdCAM, нуклеотидных и аминокислотных последовательностей связывающего домена $\alpha_4\beta_7$ MAdCAM яванского макака и нуклеотидных и аминокислотных последовательностей пяти модифицированных антител против MAdCAM.

[0344] В SEQ ID NO: 1-48 и 148-150 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи каппа для тринадцати моноклональных антител человека против MAdCAM: 1.7.2 (SEQ ID NO: 1-4), 1.8.2 (SEQ ID NO: 5-8), 6.14.2 (SEQ ID NO: 9-12), 6.22.2 (SEQ ID NO: 13-16), 6.34.2 (SEQ ID NO: 17-20), 6.67.1 (SEQ ID NO: 21-24), 6.73.2 (SEQ ID NO: 25-28), 6.77.1 (SEQ ID NO: 29-32), 7.16.6 (SEQ ID NO: 33-36), 7.20.5 (SEQ ID NO: 37-40), 7.26.4 (SEQ ID NO: 41-44), 9.8.2 (SEQ ID NO: 45-48), X481.2 (SEQ ID NO: 35, 148-150).

[0345] В SEQ ID NO: 49-50 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности связывающего домена $\alpha 4\beta 7$ MAdCAM яванского макака.

[0346] В SEQ ID NO: 51-68 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи каппа для модифицированных антител против MAdCAM: 6.22.2 (SEQ ID NO: 51-54), модифицированного 6.34.2 (SEQ ID NO: 55-58), модифицированного 6.67.1 (SEQ ID NO: 59-62), модифицированного 6.77.1 (SEQ ID NO: 63-66) и нуклеотидных и аминокислотных последовательностей легкой цепи каппа антитела против MAdCAM: модифицированного 7.26.4 (SEQ ID NO: 67-68). В SEQ ID NO: 70-106 и 108-110 представлены различные последовательности праймеров.

Ключ:

Сигнальная последовательность: подчеркнутые строчные буквы

Аминокислотные замены в последовательности модифицированных антител против MAdCAM по сравнению с исходной последовательностью: подчеркнутые прописные буквы

SEQ ID № 1

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 1.7.2

1	<u>atggagtttg</u>	<u>ggctgagctg</u>	<u>gattttcctt</u>	<u>gctgctattt</u>	<u>taaaaggtgt</u>
51	<u>ccagtgt</u> GAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCTTG	GTGAAGCCTG
101	GGGGGTCCCT	TAGACTCTCC	TGTGTAGCCT	CTGGATTCAC	TTTCACTAAC
151	GCCTGGATGA	TCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	TGGCCGTATT	AAAAGGAAAA	CTGATGGTGG	GACAACAGAC	TACGCTGCAC
251	CCGTGAAAGG	CAGATTCACC	ATCTCAAGAG	ATGATTCAAA	AAACACGCTG
301	TATCTGCAAA	TGAACAGCCT	GAAAACCGAG	GACACAGCCG	TGTATTACTG
351	TACCACAGGG	GGAGTGGCTG	AGGACTACTG	GGGCCAGGGA	ACCCTGGTCA
401	CCGTCTCCTC	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCGCCC
451	TGCTCCAGGA	GCACCTCCGA	GAGCACAGCG	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA
501	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAAC TCA	GGCGCTCTGA
551	CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCAGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC
601	TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAACTTCG	GCACCCAGAC
651	CTACACCTGC	AACGTAGATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA
701	CAGTTGAGCG	CAAATGTTGT	GTCGAGTGCC	CACCGTGCCC	AGCACCACCT
751	GTGGCAGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	CCAAAACCCA	AGGACACCCT
801	CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACGTG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC
851	ACGAAGACCC	CGAGGTCCAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG
901	CATAATGCCA	AGACAAAGCC	ACGGGAGGAG	CAGTTCAACA	GCACGTTC CG
951	TGTGGTCAGC	GTCTCACC	TTGTGCACCA	GGACTGGCTG	AACGGCAAGG
1001	AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA
1051	ACCATCTCCA	AAACCAAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG	TGTACACCCT
1101	GCCCCCATCC	CGGGAGGAGA	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC
1151	TGGTCAAAGG	CTTCTACCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT
1201	GGGCAGCCGG	AGAACAAC TA	CAAGACCACA	CCTCCCATGC	TGGACTCCGA
1251	CGGCTCCTTC	TTCTCTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC
1301	AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC
1351	CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CCGGGTAAAT	GA

SEQ ID № 2

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 1.7.2

```

1   mefglswifl aailkgvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CVASGFTFTN
51  AWMIWVRQAP GKGLEWVGRI KRKTDGGTTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL
101 YLQMNSLKTE DTAVYYCTTG GVAEDYWQGG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
151 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
201 SLSSVVTVPs SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP
251 VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV
301 HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK
351 TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN
401 GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN
451 HYTQKSLSLS PGK

```

SEQ ID № 3

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 1.7.2

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg
51  atccagtggg GATATTGTGA TGACTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CAAAGTAATG GATACAACTA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTC TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACTATC ACCTTCGGCC AAGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID № 4

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 1.7.2

```

1   mrlpaqlgl lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL
51  QSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTI TFGQGTREI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
202 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

SEQ ID № 5

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 1.8.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg gatttttcctt gctgctatatt taaaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTGAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT TAGACTCTCC TGTGTAGTCT CTGGATTACAC TTTCACATAAC
151 GCCTGGATGA TCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 TGGCCGTATT AAAAGGAAAA CTGATGGTGG GACAACAGAC TACGCTGCAC
251 CCGTGAAAGG CAGATTCACC ATCTCAAGAG ATGATTCAAA AAACACGCTG
301 TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAAAACCGAG GACACAGCCG TGTATTACTG
351 TACCACAGGG GGAGTGGCTG AGGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA
401 CCGTCTCCTC AGCCTCCACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCGCCC
451 TGCTCCAGGA GCACCTCCGA GAGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
501 GGACTIONTC CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAACCTCA GGCCTCTGA
551 CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCAGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC
601 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAACTTCG GCACCCAGAC
651 CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
701 CAGTTGAGCG CAAATGTTGT GTCGAGTGCC CACCGTGCCC AGCACACCT
751 GTGGCAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAACCCA AGGACACCTT
801 CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC
851 ACGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
901 CATAATGCCA AGACAAAGCC ACGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTTCCG
951 TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TTGTGCACCA GGACTGGCTG AACGGCAAGG
1001 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
1051 ACCATCTCCA AAACCAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCTT
1101 GCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC
1151 TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
1201 GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACA CCTCCCATGC TGGACTCCGA
1251 CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC
1301 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
1351 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAAT GA

```

SEQ ID № 6

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 1.8.2

```

1   mefglswifl aailkgvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CTVSGFTFTN
51  AWMIWVRQAP GKGLEWVGRI KRKTDGGTTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL
101 YLQMNLSLKTE DTAIVYYCTTG GVAEDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
151 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
201 SLSSVTVFPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP
251 VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV
301 HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK
351 TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN
401 GQPENNYKTT PPMLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN
451 HYTQKSLSLG PGK

```

SEQ ID № 7

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 1.8.2

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggggtctctgg
51  atccagtggg GATATTGTGA TGA CTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CAAAGTAATG GATTCAACTA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTC TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACTATC ACCTTCGGCC AAGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID № 8

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 1.8.2

```

1   mrlpaqllg1 lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL
51  QSNGFNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTI TFGQGRLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
202 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

SEQ ID № 9

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 6.14.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGACTCAC CTTTAACAAT
151 TCTGCCATGA CCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCAACTACT AGTGGAAGTG GTGGTACCAC ATACTACGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACTCTC CCAAGAACAC GCTCTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCCGTATATT ACTGTGCGGC
351 CCGTGGATAC AGCTATGGTA CGACCCCTTA TGAGTACTGG GGCCAGGGAA
401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC
451 CTGGCGCCCT GTTCCAGGAG CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAACTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACGAAGACC TACACCTGCA ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAG AGTTGAGTCC AAATATGGTC CCCCATGCCC ATCATGCCCA
751 GCACCTGAGT TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCCTGTTCC CCCCAAACC
801 CAAGGACACT CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGTGGTGG
851 TGGACGTGAG CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT
901 GCGTGAGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA
951 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
1001 TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC
1051 TCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAGCCACA
1101 GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCAGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA
1151 GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1201 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
1251 GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAGGCTA ACCGTGGACA
1301 AGAGCAGGTG GCAGGAGGGG AATGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
1351 GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCTGGGTAA
1401 ATGA

```

SEQ ID № 10

Спрогнозированная последовательность тяжелой цепи 6.14.2

```

1   mefglswlfl vailkgvqcE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGLTFNN
51  SAMTWVRQAP GKGLEWVSTT SGSGGTYYA DSVKGRFTIS RDSPKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCAARGY SYGTPYEYW GQGLVTVSS ASTKGPSVFP
151 LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
201 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP
251 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
351 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
401 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
451 ALHNHYTQKS LSLSLGK

```

SEQ ID № 11

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 6.14.2

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgagggggcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT AGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCGGAGC
151 ATTAGCAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 AGTCCTGATC TTTTTTGTGT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC CCATCAAGGT
251 TCAGTGGCAG TGGCTCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGTCTG
301 CAACCTGAAG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CAACAGAATT ACATTCCCCC
351 TATTACCTTC GGCCAGGGGA CACGACTGGA GATCAGACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA G

```

SEQ ID № 12

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 6.14.2

```

1   mdmrvpaql1 gl1111wlrga rcDIQMTQSP SLSASVGDR VTITCRASRS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKVL IFFVSSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL
101 QPEDFATYYC QQNYIPPITF GQGTRLEIRR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
202 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID № 13

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 6.22.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGACACAC CTCAGTAGC
151 GATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATATTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT ACTGTGCGAG
351 AGATCCCGGC TACTATTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCTTCC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT CCCCTGGCG
451 CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCCGCCCTGG GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
551 TGACCAGCGG CGTGACACAC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACGAA
651 GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701 AGAGAGTTGA GTCCAAATAT GGTCCCCCAT GCCCATCATG CCCAGCACCT
751 GAGTTCCTGG GGGGACCATC AGTCTTCCTG TTCCCCCCTG AACCCAAGGA
801 CACTCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG
851 TGAGCCAGGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGATGGCGTG
901 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC
951 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAACG
1001 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGGCCTCCC GTCCTCCATC
1051 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCGAGAGC CACAGGTGTA
1101 CACCCTGCCC CCATCCCAGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1151 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
1201 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCGCGCCTC CCGTGCTGGA
1251 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAG GCTAACCGTG GACAAGAGCA
1301 GGTGGCAGGA GGGGAATGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
1351 CACAACCACT ACACACAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCTGG GTAAATGA

```

SEQ ID № 14

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 6.22.2

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGHTFSS
51  DGMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDPG YYGMDVWQO GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA
151 PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201 YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPSCPAP
251 EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
301 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
351 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
401 SNGQPENNYK TAPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
451 HNHYTQKSL LSLGK

```

SEQ ID № 15

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 6.22.2

```

1   atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAAATTTC ACCCTCACCA TCAATGGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTTATTACTG TCATCAGAGT GGTCGTTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA

```

SEQ ID № 16

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 6.22.2

```

1   mlpsqligfl llwvpasrgE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQQKPD QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTNF TLTINGLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

```

SEQ ID № 17

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 6.34.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg gggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51   ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101  GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151  TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201  GGCAGTTATA TCAAATGATG GAAATAATAA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251  AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAAAACAC GCTGTATCTG
301  CAAATGAACA GCCTGAGCGC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351  AGATAGTACG GCGATAACCT ACTACTACTA CGGAATGGAC GTCTGGGGCC
401  AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTCAGCTT CCACCAAGGG CCCATCCGTC
451  TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCCGCCCT
501  GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCTGTGA
551  ACTCAGGCGC CCTGACCAGC GGCGTGCACA CCTTCCCGGC TGTCTACAG
601  TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAG
651  CTTGGGCACG AAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA
701  CCAAGGTGGA CAAGAGAGTT GAGTCCAAAT ATGGTCCCCC ATGCCCATCA
751  TGCCACGAC CTGAGTTCCT GGGGGGACCA TCAGTCTTCC TGTTCCCCCC
801  AAAACCCAAG GACACTCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851  TGGTGGTGGA CGTGAGCCAG GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901  GTGGATGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA
951  GTTCAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCGTCTCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 GCCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCA GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG ACAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC
1251 TCCCGTGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AGGCTAACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACACAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCT
1401 GGGTAAATGA

```

SEQ ID № 18

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 6.34.2

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51   YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI SNDGNNKYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101  QMNSLSAEDT AVYYCARDST AITYYYGMD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV
151  FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
201  SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPS
251  CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY
301  VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351  PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401  VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM
451  HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

```

SEQ ID № 19

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 6.34.2

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAAT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATTG GTTTCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCGGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGGACTCTG
301 CAACCTGATG ATTTTGCAAC TTACTCCTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

SEQ ID № 20

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 6.34.2

```

1   mdmrvpaql1 gl1111wlrga rcDIQMTQSP SLSASVGDR VTITCRASQN
51  ISSYLNWFQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFSGSGSG TDFTLTIRTL
101 QPDDFATYSC HQSYSLPFTF GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201 LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID № 21

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 6.67.1

```

1   atgaaacacc tgtgggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtcccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCAGTGTCT CTGGTGACTC CATCAGTAGT
151 AACTATTGGA GCTGGATCCG GCAGCCCGCC GGGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCAGTG GGGGCACCAA CTCCAACCCC TCCCTCAGGG
251 GTCGAGTCAC CATTTTAGCA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCTCTGAAA
301 CTGAGTTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 TCGTATTACT ATAATTCGGG GACTTATTCC ATCCTTCTTT GACTACTGGG
401 GCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG CTTCCACCAA GGGCCCATCC
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCCGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT
551 GGAAGTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTA
601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAGCTTGGGC ACGAAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGAGA GTTGAGTCCA AATATGGTCC CCCATGCCCA
751 TCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC
801 CCCAAAACCC AAGGACACTC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACGT
851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAACTGG
901 TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
951 GCAGTTCAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
1001 AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC
1051 CTCCCGTCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
1101 AGAGCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA
1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC
1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
1251 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAGGCTAA
1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ATGTCTTCTC ATGCTCCGTG
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACA CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
1401 TCTGGGTAAA TGA

```

SEQ ID № 22

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 6.67.1

```

1   mkhlwfflll vaaprwvlsQ VQLQESGPGI VKPSETLSLT CTVSGDSISS
51  NYWSWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGGTNSNP SLRGRVTILA DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYYCARDRIT IIRGLIPSFF DYWGQGTTLVT VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP
251 SCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW
301 YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG
351 LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
401 AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
451 MHEALHNHYT QKSLSLSLKG

```

SEQ ID № 23

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 6.67.1

```

1   atggtgttgc agacccaggt cttcatttct ctggttgcctt ggatctcttg
51  tgccctacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAC CTACTTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAAG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCCTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAAGTTCTA
501 TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAAGTCCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGTGA

```

SEQ ID № 24

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 6.67.1

```

1   mvlqtqvfis lllwisgayg DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNNKTYLA WYQQKPRQPP KLLIYWASIR EYGVPRDFSG SGSGTDFTLT
101 ISSLQAEDVA VFYFCQQYYSI PPLTFGGGTK VEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNMFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY
201 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRRGE C

```

SEQ ID № 25

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 6.73.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctatatt taaaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGACTTG GTCCAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTTAGAAGT
151 TATGCCATGA ACTGGGTCCG ACAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCAGTTATT AGTGGTCGTG GTGGTACTAC ATACTACGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACGCG GCCGTATATT ACTGTGCGAA
351 GATAGCAGTG GCTGGAGAGG GGCTCTACTA CTACTACGGT ATGGACGTCT
401 GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT CAGCTTCCAC CAAGGGCCCA
451 TCCGTCTTCC CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAACACAGC
501 CGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT
551 CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC
601 CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC
651 TAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCA
701 GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCCATGC
751 CCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCCTGGGG GGACCATCAG TCTTCCTGTT
801 CCCCCCAAAA CCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTC AAC
901 TGGTACGTGG ATGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGC
1301 TAACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACACAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCTGGGT AAATGATAG

```

SEQ ID № 26

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 6.73.2

```

1   mefglswlfl vailkgvqcE VQLLESGGDL VQPGGSLRLS CAASGFTFRS
51  YAMNWVRQAP GKGLEWVSVI SGRGGTTYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDA AVYYCAKIAV AGEGLYYYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP
151 SVFPLAPCSR STSENTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
201 LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTKTYTCNVD HKPSNTKVDK RVESKYGPPC
251 PSCPAPEFLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS
451 VMHEALHNHY TQKSLSLSLG K

```

SEQ ID № 27

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 6.73.2

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgagggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT AGGTGACAGA GTCACCTTCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAAC
151 ATTACCAACT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AGGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCGT CCAGTTTGCC AAGAGGGGTC CCATCAAGGT
251 TCCGTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCa CTCTCACCAT CAGCAGTCTG
301 CAACCTGAAG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CAACAGAGTT ACAGTAATCC
351 TCCGGAGTGC GGTTTTGGCC AGGGGACCAC GCTGGATATC AAACGAAGTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID № 28

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 6.73.2

```

1   mdmrvpaql1 gl1111wlr1a rcDIQMTQSP SLSASVGDR VTFTCRASQN
51  ITNYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASSLPRGV PSRFRGSGSG TDFTLTISL
101 QPEDFATYYC QQSYSNPPEC GFGQGTTLDI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

SEQ ID № 29

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 6.77.1

```

1   atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctatatt tagaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTCAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTACAC CTTCAGTAGC
151 TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCATCCATT AGTAGTAGTA GTAGTTACAT ATACTACGCA GACTCAGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAAGCTC ACTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATGGGTAT AGCAGTGGCT GGTCCTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCTTC CACCAAGGGC
451 CCATCCGCTT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCGGCT
601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAGC TTGGGCACGA AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGAGAGTTG AGTCCAAATA TGGTCCCCCA
751 TGCCCATCAT GCCCAGCACC TGAGTTCCTG GGGGGACCAT CAGTCTTCCT
801 GTTCCCCCA AAACCAAGG AACTCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG
851 TCACGTGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCAGG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC
901 AACTGGTACG TGGATGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG
951 GGAGGAGCAG TTCAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC
1001 TGCACCAGGA CTGGCTGAAC GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
1051 AAAGGCCTCC CGTCCTCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA
1101 GCCCCGAGAG CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCAG GAGGAGATGA
1151 CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCAGC
1201 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA
1251 GACCACGCCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA
1301 GGCTAACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGG AGGGGAATGT CTTTTCACGC
1351 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACACAGA AGAGCCTCTC
1401 CCTGTCTCTG GGTAAATGAT AGGAATTCTG ATGA

```

SEQ ID № 30

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 6.77.1

```

1   melglrwvfl vailegvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTFSS
51  YSMNWVRQAP GKGLEWVSSI SSSSYIYYA DSVKGRFTIS RDNKNSLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDGY SSGWSYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
251 CPSCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
301 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
351 KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
401 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSR
451 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL GK

```

SEQ ID № 31

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 6.77.1

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CTCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA ACTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CTTAGTGATG GAAAGACCTA TTTGAATTGG TACCTGCAGA AGCCCGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTC TCTGGAGTGC
251 CAGACAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGTT TATTCCTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTATG TGCAGTTTTG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID № 32

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 6.77.1

```

1   mrlpaql lgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCNSSQSL
51  LSDGKTYLNW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVG VYSCMQSIQLM CSFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPPREK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

```

SEQ ID № 33

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 7.16.6

```

1   atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc
51  ccactccCAG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151 TATGGTATCA ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
201 GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AAACATATGCA CAGAAGGTCC
251 AGGGCAGAGT CACCATGACC GCAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
301 GACCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGAGGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA TTACGGTATG GACGTCTGGG
401 GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACC GGTTG ACGGTGTCGT
551 GGAACCTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTA
601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751 CCGTGCCCGC CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAAC TACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGTAAATGA

```

SEQ ID № 34

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 7.16.6

```

1   mdwtwsilfl vaaatgahsQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTS
51  YGINWVRQAP GQGLEWMGWI SVYSGNTNYA QKVQGRVTMT ADTSTSTAYM
101 DLRSLRSDDT AVYYCAREGS SSSGDYYYGM DVWGQGTTVT VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVVS VLT V VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSV
451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

SEQ ID № 35

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 7.16.6 и нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа X481.2

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CATACTGATG GAACGACCTA TTTGTATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGATT TATTACTGCA TGCAAAATAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID № 36

Белковая последовательность легкой цепи каппа 7.16.6

```

1   mrlpaqllg1 lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  HTDGTTYLYW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGI YYCMQNIQLP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID № 37

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 7.20.5

```

1   atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCACGTCTC CTGGTAGCTC CATCAGTAGT
151 TACCACTGGA ACTGGATCCG GCAGCCCGCC GGGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCAGTG GGAGCACCAA CTACAACCCC TCCCTCAAGA
251 GTCGAGTCAC CATGTCTACTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAG
301 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 GGGGGTCAGG TATTACTATG CTTCTGGGGAG TTATTACTAC GGTCTGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGGC
451 CCATCGGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCTGTGGA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCAGCT
601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTGCGAG
751 TGCCCAACCGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
801 CCCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAAC
901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTTGTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACACCTCCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
1301 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCCGGGT AAATGA

```

SEQ ID № 38

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 7.20.5

```

1   mkhlwfflll vaaprwvlsQ VQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGSSISS
51  YHWNWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGSTNYPN SLKSRVTMSL DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYYCAREGVR YYYASGSYYY GLDVWGQGT TTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVKRCCKVE
251 CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTPPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS
451 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

SEQ ID № 39

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 7.20.5

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg
51  atccagtggg GATATTGTGA TGA CTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CATGGTAATG GATACAAC TA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTT TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACCTCTC ACTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTGGAGATC AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAC TG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGGAAG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAC TCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTGTA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID № 40

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 7.20.5

```

1   mrlpaql lgl lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL
51  HGNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLG SNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

SEQ ID № 41

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 7.26.4

1	atggactgga	cctggagcat	ccttttcttg	gtggcagcag	caacaggtgc
51	ccactccCAG	GTTCAGCTGG	TGCAGTCTGG	AGCTGAGGTG	AAGAAGCCTG
101	GGGCCTCAGT	GAAGGTCTCC	TGCGAGGCTT	CTGGTTACAC	CTTTACCAGC
151	TATGGTATCG	ACTGGGTGCG	ACAGGCCCTT	GGACAAGGGC	TTGAGTGGAT
201	GGGATGGATC	AGCGTTTACA	GTGGTAACAC	AAACTATGCA	CAGAAGCTCC
251	AGGGCAGAGT	CACCATGTCC	ACAGACACAT	CCACGAGCAC	AGCCTACATG
301	GAGCTGAGGA	GCCTGAGATC	TGACGACACG	GCCGTGTATT	ACTGTGCGAG
351	AGAGGGTAGC	AGCTCGTCCG	GAGACTACTA	CTACGGTATG	GACGTCTGGG
401	GCCAAGGGAC	CACGGTCACC	GTCTCCTCAG	CCTCCACCAA	GGGCCCATCG
451	GTCTTCCCCC	TGGCGCCCTG	CTCCAGGAGC	ACCTCCGAGA	GCACAGCGGC
501	CCTGGGCTGC	CTGGTCAAGG	ACTACTTCCC	CGAACC GG TG	ACGGTGTCTG
551	GGAAC TCAGG	CGCTCTGACC	AGCGGCGTGC	ACACCTTCCC	AGCTGTCCTA
601	CAGTCCTCAG	GACTCTACTC	CCTCAGCAGC	GTGGTGACCG	TGCCCTCCAG
651	CAACTTCGGC	ACCCAGACCT	ACACCTGCAA	CGTAGATCAC	AAGCCCAGCA
701	ACACCAAGGT	GGACAAGACA	GTTGAGCGCA	AATGTTGTGT	CGAGTGCCCA
751	CCGTGCCCAG	CACCACCTGT	GGCAGGACCG	TCAGTCTTCC	TCTTCCCCCC
801	AAAACCCAAG	GACACCCTCA	TGATCTCCCG	GACCCCTGAG	GTCACGTGCG
851	TGGTG GTGGA	CGTGAGCCAC	GAAGACCCCG	AGGTCCAGTT	CAACTGGTAC
901	GTGGACGGCG	TGGAGGTGCA	TAATGCCAAG	ACAAAGCCAC	GGGAGGAGCA
951	GTTCAACAGC	ACGTTCCGTG	TGGTCAGCGT	CCTCACCGTT	GTGCACCAGG
1001	ACTGGCTGAA	CGGCAAGGAG	TACAAGTGCA	AGGTCTCCAA	CAAAGGCCTC
1051	CCAGCCCCCA	TTGAGAAAAC	CATCTCCAAA	ACCAAAGGGC	AGCCCCGAGA
1101	ACCACAGGTG	TACACCCTGC	CCCCATCCCG	GGAGGAGATG	ACCAAGAACC
1151	AGGTCAGCCT	GACCTGCCTG	GTCAAAGGCT	TCTACCC CAG	CGACATCGCC
1201	GTGGAGTGGG	AGAGCAATGG	GCAGCCGGAG	AACA ACTACA	AGACCACACC
1251	TCCCATGCTG	GACTCCGACG	GCTCCTTCTT	CCTCTACAGC	AAGCTCACCG
1301	TGGACAAGAG	CAGGTGGCAG	CAGGGGAACG	TCTTCTCATG	CTCCGTGATG
1351	CATGAGGCTC	TGCACAACCA	CTACACGCAG	AAGAGCCTCT	CCCTGTCTCC
1402	GGGTAAATGA				

SEQ ID № 42

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 7.26.4

1	mdwtwsilfl	vaaatgahsQ	VQLVQSGAEV	KKPGASVKVS	CEASGYTFTS
51	YGIDWVRQAP	GQGLEWMGWI	SVYSGNTNYA	QKLQGRVTMS	TDTSTSTAYM
101	ELRSLRSDDT	AVYYCAREGS	SSSGDYYYGM	DVWGQGTTVT	VSSASTKGPS
151	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
201	QSSGLYSLSS	VVTVPSSNFG	TQTYTCNVDH	KPSNTKVDKT	VERKCCVECP
251	PCPAPPVAGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVQFNWY
301	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TFRVVSVLTV	VHQDWLNGKE	YKCKVSNKGL
351	PAPIEKTISK	TKGQPREPQV	YTLPPSREEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
401	VEWESNGQPE	NNYKTTTPML	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM
451	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK			

SEQ ID № 43

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 7.26.4

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAATCA GAGCCTCCTG
151 TATAGTGATG GAAAGACCTA TTTGTTTTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGATTC TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID № 44

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 7.26.4

```

1   mrlpaqlgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSNQSLL
51  YSDGKTYLFW YLQKPGQPPQ LLIYEVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQSIQLP WTFQGQTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPRKAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID № 45

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 9.8.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGTAATGA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 GGGGGCGTAC CACTTTGCCT ACTGGGGCCA GGGAACCCTG GTCACCGTCT
401 CCTCAGCTTC CACCAAGGGC CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC
451 AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA
501 CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG
551 GCGTGACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC
601 AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACGA AGACCTACAC
651 CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGAGAGTTG
701 AGTCCAAATA TGGTCCCCCA TGCCCATCAT GCCCAGCACC TGAGTTCCTG
751 GGGGGACCAT CAGTCTTCCT GTTCCCCCA AAACCCAAGG ACACTCTCAT
801 GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCAGG
851 AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGATGGCGT GGAGGTGCAT
901 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA CGTACCGTGT
951 GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC GGCAAGGAGT
1001 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCTCC CGTCCTCCAT CGAGAAAACC
1051 ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAG CCACAGGTGT ACACCCTGCC
1101 CCCATCCCAG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG
1151 TCAAAGGCTT CTACCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
1201 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG
1251 CTCCTTCTTC CTCTACAGCA GGCTAACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGG
1301 AGGGGAATGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC
1351 TACACACAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCTG GTTAAATGA

```

SEQ ID № 46

Спрогнозированная белковая последовательность тяжелой цепи 9.8.2

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNEYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARGAY HFAYWGQGLT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS
151 RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL
201 SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP CPSCPAPEFL
251 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH
301 NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT
351 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
401 QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN
451 YTQKSLSLSL GK

```

SEQ ID № 47

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа 9.8.2

```

1   atggacatga gggtcacctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct
51  ctcaagtcgca ggtgccagat gtGACATCCA GATGACCCAG TCTCCATCCT
101 CCCTGTCTGC ATCTGTAGGA GACAGAGTCA CCATCACTTG CCAGGCGAGT
151 CAGGACATTA GCAACTATTT AAATTGGTAT CAGCAGAAAC CAGGGAAAGC
201 CCCTAAGCTC CTGATCTACG ATGCATCCAA TTTGGAAACA GGGGTCCCAT
251 CAAGGTTTCA TGAAGATAT TGCAACATAT TCCTGTCAAC ACTCTGATAA
301 AGCCTGCAGC CTGAAGATAT TGCAACATAT TCCTGTCAAC ACTCTGATAA
351 TCTCTCGATC ACCTTCGGCC AGGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ACCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCGCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID № 48

Спрогнозированная белковая последовательность легкой цепи каппа 9.8.2

```

1   mdmrvpaql l gllllwlsva garcDIQMTQ SPSSLASVVG DRVITITQAS
51  QDISNYLNWY QQKPGKAPKL LIYDASNLET GVPSRFSGSG SGTDFTFITIS
101 SLQPEDIATY SCQHSNLSI TFGQGTREI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREKAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC

```

SEQ ID № 49

Нуклеотидная последовательность связывающего домена $\alpha^4\beta^7$ MAdCAM яванского макака

```

1   ATGGATCGGG GCCTGGCCCT CCTGCTGGCG GGGCTTCTGG GGCTCCTCCA
51  GCCGGGCTGC GGCCAGTCCC TCCAGGTGAA GCGGCTGCAG GTGGAGCCCC
101 CGGAGCCGGT GGTGGCCGTG GCCCTGGGCG CCTCTCGCCA GCTCACCTGC
151 CGCCTGGACT GCGCGGACGG CGGGGCCACG GTGCAGTGGC GGGGCCTGGA
201 CACCAGCCTG GGCGCGGTGC AGTCGGACGC GGGCCGCAGC GTCCTCACCG
251 TGCGCAACGC CTCGCTGTCT GCGGCCGGGA CCCGTGTGTG CGTGGGCTCC
301 TGCGGGGGCC GCACCTTCCA GCACACCGTG CGGCTCCTTG TGTACGCCTT
351 CCCGGACCAG CTGACCATCT CCCCGGCAGC CCTGGTGCCT GGTGACCCGG
401 AGGTGGCCTG TACGGCTCAC AAAGTCACGC CTGTGGACCC CAATGCGCTC
451 TCCTTCTCCC TGCTCCTGGG GGACCAGGAA CTGGAGGGGG CCCAGGCTCT
501 GGGCCCGGAG GTGGAGGAGG AGGAGGAGCC CCAGGAGGAG GAGGACGTGC
551 TGTTCAAGGT GACAGAGCGC TGGCGGCTGC CGACCCTGGC AACCCTGTCT
601 CTGCGCGCGC TCTACTGCCA GGCCACGATG AGGCTGCCTG GCTTGGAGCT
651 CAGCCACCGC CAGGCCATCC CGGTCCTGCA C

```

SEQ ID № 50

Аминокислотная последовательность связывающего домена $\alpha^4\beta^7$ MAdCAM яванского макака

```

1   MDRGLALLLA GLLGLLQPGC GQSLQVKPLQ VEPPEPVVAV ALGASRQLTC
51  RLDCADGGAT VQWRGLDTSI GAVQSDAGRS VLTVRNASLS AAGTRVCVGS
101 CGGRTFQHTV RLLVYAFPDQ LTISPAALVP GDPEVACTAH KVTVPDPNAL
151 SFSLLLGDQE LEGAQAALGPE VEEEEEPQEE EDVLFRTVTER WRLPTLATPV
201 LPALYCQATM RLPGLELSHR QAIPVLH

```

SEQ ID № 51

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.22.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTCAC CTCAGTAGC
151 GATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATATTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT ACTGTGCGAG
351 AGATCCCGGC TACTATTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCTTCC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT CCCCCTGGCG
451 CCCTGCTCTA GAAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC
551 TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCAGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAACT TCGGCACCCA
651 GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701 AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTCGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA
751 CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC
801 CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA
851 GCCACGAAGA CCCCAGAGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
901 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCACGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT
951 CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTTGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
1001 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CCCATCGAG
1051 AAAACCATCT CAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC
1101 CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
1151 GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
1201 AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC
1251 CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
1301 GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1351 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGATAG

```

SEQ ID № 52

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.22.2

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  DGMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDPG YYYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA
151 PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPCPAP
251 PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE
301 VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE
351 KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
401 NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
451 NHYTQKSLSL SPGK

```

SEQ ID № 53

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа модифицированного 6.22.2

```

1   atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAGATTTC ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTTATTACTG TCATCAGAGT GGTCGTTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA

```

SEQ ID № 54

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа модифицированного
6.22.2

```

1   mlpsqligfl llwvpasrgE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQQKPD QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTDF TLTINSLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

```

SEQ ID № 55

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.34.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTACAC CTTCAGTAGC
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAGTTATA TCAAATGATG GAAATAATAA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAAAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGCGCGC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATAGTACG GCGATAACCT ACTACTACTA CGGAATGGAC GTCTGGGGCC
401 AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTCAGCTT CCACCAAGGG CCCATCCGTC
451 TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC TAGAAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT
501 GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA
551 ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GCGGTGCACA CCTTCCCAGC TGTCTACAG
601 TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
651 CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA
701 CCAAGGTGGA CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCGA GTGCCCACCG
751 TGCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA
801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGC GTGG
851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG
901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
951 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT
1001 GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA
1051 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
1151 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG
1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1251 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CTTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG
1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1401 TAAATGATAG

```

SEQ ID № 56

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.34.2

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI SNDGNNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDST AITYYYYGMD VWGQGT TVTV SSASTKGPSV
151 FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
201 SSGLYSLSSV VTPVSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP
251 CPAPPVAGPS VFLEPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV
301 DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
351 APIEKTISKI KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401 EWESNGQPEN NYKTT PMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451 EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

SEQ ID № 57

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа модифицированного 6.34.2

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAGT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCGGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGTTCTCTG
301 CAACCTGAGG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

SEQ ID № 58

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа модифицированного
6.34.2

```

1   mdmrvpaql1 gl111wlrga rcDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASQS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL
101 QPEDFATYYC HQSYSLPFTF GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID № 59

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.67.1

```

1   atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtcccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCCTGTCT CTGGTGA CTCAGTAGT
151 AACTATTGGA GCTGGATCCG GCAGCCCGCC GGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCACTG GGGGCACCAA CTCCAACCCC TCCCTCAGGG
251 GTCGAGTCAC CATGTCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCTCTGAAA
301 CTGAGTTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 TCGTATTACT ATAATTCGGG GACTTATTCC ATCCTTCTTT GACTACTGGG
401 GCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG CTTCACCAA GGGCCCATCC
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCTAGAAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT
551 GGAACCTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTA
601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751 CCGTGCCCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCC GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCATT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAATAACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGTAAATGA TAG

```

SEQ ID № 60

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.67.1

```

1   mkhlwfflll vaaprwvlsQ VQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGDSISS
51  NYWSWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGGTNSNP SLRGRVTMSV DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYYCARDRIT IIRGLIPSFF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQTYTCNV DH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVVS VLT V VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

SEQ ID № 61

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа модифицированного 6.67.1

```

1   atggtgttgc agacccaggt cttcatttct ctggttgcctt ggatctcttg
51  tgcctacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAA CTAUCTTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAGG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCCTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAUACTGC CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAUACTTCTA
501 TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAUACTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGCC TGCUGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGTGA

```

SEQ ID № 62

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа модифицированного

6.67.1

```

1   mvlqtqvUfis lllwisgayg DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNNKNYLA WYQQKPGQPP KLLIYWASIR EYGVUPDRFSG SGSGTDFTLT
101 ISSLQAEDVA VYFCQQYYSI PPLTFGGGTK VEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY
201 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTUKSFNRGE C

```

SEQ ID № 63

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.77.1

```

1   atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctatatt tagaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTCAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTACAC CTTCAGTAGC
151 TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGGGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCATCCATT AGTAGTAGTA GTAGTTACAT ATACTACGCA GACTCAGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC ACTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATGGGTAT AGCAGTGGCT GGTCTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCTTC CACCAAGGGC
451 CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCT AGAAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCTGGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCAGCT
601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTCGAG
751 TGCCCAACGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
801 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAAC
901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTTGTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACACCTCCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
1301 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCCGGGT AAATGATAG

```

SEQ ID № 64

Белковая последовательность тяжелой цепи модифицированного 6.77.1

```

1   melglrwvfl vailegvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTFSS
51  YSMNWVRQAP GKGLEWVSSI SSSSYIYYA DSVKGRFTIS RDNKNSLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDGY SSGWSYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTKVERKCCVE
251 CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS
451 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

SEQ ID № 65

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа модифицированного 6.77.1

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CTCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CTTAGTGATG GAAAGACCTA TTTGAATTGG TACCTGCAGA AGCCCGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGACAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTATG TGCAGTTTTG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID № 66

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа модифицированного
6.77.1

```

1   mrlpaqlgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  LSDGKTYLNW YLQKPGQPPQ LLIYEVS NFR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YSCMQSIQLM SSFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

```

SEQ ID № 67

Нуклеотидная последовательность легкой цепи каппа модифицированного 7.26.4

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 TATAGTGATG GAAAGACCTA TTTGTTTTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGATTTC TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID № 68

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа модифицированного
7.26.4

```

1   mrlpaqllgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLI
51  YSDGKTYLFW YLQKPGQPPQ LLIYEVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQSIQLP WTFGQGTKE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID NO: 148

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи X481.2

```

1   QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYGINWVRQA PGQGLEWMGW
51  ISVYSGNTNY AQKVQGRVTM TADTSTSTAY MDLRLRSDD TAVYYCAREG
101 SSSSGDY YYG MDVWGQGT TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG
151 CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSNPF
201 GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP
251 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
300 STFRVSVSLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ
351 VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM
401 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

SEQ ID NO: 149

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи X481.2

```

1   ATGGACTGGA CCTGGAGCAT CCTTTTCTTG GTGGCAGCAG CAACAGGTGC
51  CCACTCCCAG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151 TATGGTATCA ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
201 GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AAACATATGCA CAGAAGGTCC
251 AGGGCAGAGT CACCATGACC GCAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
301 GACCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGAGGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA TTACGGTATG GACGTCTGGG
401 GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCAGGTG ACGGTGTCGT
551 GGAACCTCAG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTTA
601 CAGTCTCTAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAACCTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751 CCGTGCCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACCTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCTGT TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGAAAATGA TAG

```

SEQ ID NO: 150

Аминокислотная последовательность легкой цепи X481.2

1	DIVMTQTPLS	LSVTPGQPAS	ISCKSSQSLL	HTDGTTYLYW	YLQKPGQPPQ
51	LLIYEVSNRF	SGVPDRFSGS	GSGTDFTLKI	SRVEAEDVGI	YYCMQNIQLP
101	WTFGQGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK
151	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDSTYSL	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE
201	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC			

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с молекулой клеточной адгезии типа "адрессин" в слизистых оболочках (MAdCAM).

2. Моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающая часть по п.1, где указанное антитело или часть обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

- (a) связываются с клетками человека;
- (b) обладает селективностью в отношении MAdCAM, превышающей селективность VCAM или фибронектина по меньшей мере в 100 раз;
- (c) связывается с MAdCAM человека с K_d 3×10^{-10} М или менее; или
- (d) ингибирует связывание клеток, экспрессирующих $\alpha_4\beta_7$, с MAdCAM человека;
- (e) ингибирует привлечение лимфоцитов в желудочно-кишечную лимфоидную ткань.

3. Моноклональное антитело человека или антигенсвязывающая часть по п.2, где указанное антитело или часть связывает MAdCAM человека с K_d 3×10^{-10} М или менее и ингибирует связывание $\alpha_4\beta_7$ с MAdCAM человека.

4. Моноклональное антитело человека по любому из п.п.1-3, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, или 90% идентичную SEQ ID NO: 148.

5. Моноклональное антитело человека по п.4, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 148.

6. Моноклональное антитело человека по п.4, где тяжелая цепь содержит от 1 до 25 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 148.

7. Моноклональное антитело человека по п.6, где тяжелая цепь содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 148.

8. Моноклональное антитело человека по любому из п.п.1-7, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичную SEQ ID NO: 150.

9. Моноклональное антитело человека по п.8, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 150.

10. Моноклональное антитело человека по п.8, где легкая цепь содержит от 1 до 25 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 150.

11. Моноклональное антитело человека по п.10, где легкая цепь содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 150.

12. Моноклональное антитело человека по любому из п.п.1-3, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичную SEQ ID NO: 148, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичную SEQ ID NO: 150.

13. Моноклональное антитело человека по п.12, где тяжелая цепь содержит

аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 148, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 150.

14. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность по любому из п.п.4-13.

15. Клетка, продуцирующая моноклональное антитело человека по любому из п.п.1-14.

16. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по п.14.

17. Гибридомная клеточная линия, которая продуцирует моноклональное антитело человека по п.1, где гибридома выбрана из группы, состоящей из 1.7.2 (номер доступа ECACC № 03090901), 1.8.2 (номер доступа ECACC № 03090902), 6.14.2 (номер доступа ECACC № 03090903), 6.22.2 (номер доступа ECACC № 03090904), 6.34.2 (номер доступа ECACC № 03090905), 6.67.1 (номер доступа ECACC № 03090906), 6.73.2 (номер доступа ECACC № 03090907), 6.77.1 (номер доступа ECACC № 03090908), 7.16.6 (номер доступа ECACC № 03090909), 7.20.5 (номер доступа ECACC № 03090910), 7.26.4 (номер доступа ECACC № 03090911) и 9.8.2 (номер доступа ECACC № 03090912).

18. Моноклональное антитело человека, продуцируемое гибридомной клеточной линией по п.17, или антигенсвязывающая часть указанного моноклонального антитела.

19. Моноклональное антитело человека по п.18, где С-концевой лизин тяжелой цепи отщеплен.

20. Моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающая часть по п.1 или 18, где указанное антитело или антигенсвязывающая часть ингибирует связывание MAdCAM человека с $\alpha_4\beta_7$, и где антитело или его часть обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

(a) перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание с MAdCAM;

(b) конкурирует с эталонным антителом за связывание с MAdCAM;

(c) связывается с тем же эпитопом MAdCAM, что и у эталонного антитела;

(d) связывается MAdCAM по существу с той же K_d , что и эталонное антитело,

(e) связывает MAdCAM по существу с той же скоростью диссоциации, что и эталонное антитело; где эталонное антитело выбрано из группы, состоящей из: моноклонального антитела 1.7.2, моноклонального антитела 1.8.2, моноклонального антитела 6.14.2, моноклонального антитела 6.22.2, моноклонального антитела 6.34.2, моноклонального антитела 6.67.1, моноклонального антитела 6.73.2, моноклонального антитела 6.77.1, моноклонального антитела 7.16.6, моноклонального антитела 7.20.5, моноклонального антитела 7.26.4, моноклонального антитела 9.8.2, моноклонального антитела X481.2, моноклонального антитела 6.22.2-mod, моноклонального антитела 6.34.2-mod, моноклонального антитела 6.67.1-mod, моноклонального антитела 6.77.1-mod и моноклонального антитела 7.26.4-mod.

21. Моноклональное антитело, которое специфически связывает MAdCAM, где антитело выбрано из группы, состоящей из:

(a) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ

ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, без сигнальных последовательностей;

(b) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8, без сигнальных последовательностей;

(c) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, без сигнальных последовательностей;

(d) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 16, без сигнальных последовательностей;

(e) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20, без сигнальных последовательностей;

(f) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24, без сигнальных последовательностей;

(g) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28, без сигнальных последовательностей;

(h) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, без сигнальных последовательностей;

(i) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36, без сигнальных последовательностей;

(j) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 40, без сигнальных последовательностей;

(k) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44, без сигнальных последовательностей;

(l) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 48, без сигнальных последовательностей;

(m) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 54, без сигнальных последовательностей;

(n) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58, без сигнальных последовательностей;

(o) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 62, без сигнальных последовательностей;

(p) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 66, без сигнальных последовательностей; и

(q) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 68, без сигнальных последовательностей.

(r) антитела, содержащего аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 148 и SEQ ID NO: 150, без сигнальной последовательности.

22. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, где тяжелая цепь указанного антитела или его части содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи или где легкая цепь содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и

7.26.4-mod.

23. Моноклональное антитело или антигенсвязывающая часть по п.22, где указанное антитело или часть содержит тяжелую цепь, в которой используется ген 1-18 VH человека, ген 3-15 VH человека, ген 3-21 VH человека, ген 3-23 VH человека, ген 3-30 VH человека, ген 3-33 VH человека или ген 4-4 VH человека.

24. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.23, где указанное антитело или часть содержит легкую цепь, в которой используется ген A2 VK человека, ген A3 VK человека, ген A26 VK человека, ген B3 VK человека, ген O12 VK человека или ген O18 VK человека.

25. Моноклональное антитело человека или антигенсвязывающая часть по п.1, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, или обе из них являются по меньшей мере на 90% идентичными аминокислотной последовательности соответствующей области или областей моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: моноклонального антитела 1.7.2, моноклонального антитела 1.8.2, моноклонального антитела 6.14.2, моноклонального антитела 6.22.2, моноклонального антитела 6.34.2, моноклонального антитела 6.67.1, моноклонального антитела 6.73.2, моноклонального антитела 6.77.1, моноклонального антитела 7.16.6, моноклонального антитела 7.20.5, моноклонального антитела 7.26.4, моноклонального антитела 9.8.2, моноклонального антитела X481.2, моноклонального антитела 6.22.2-mod, моноклонального антитела 6.34.2-mod, моноклонального антитела 6.67.1-mod, моноклонального антитела 6.77.1-mod и моноклонального антитела 7.26.4-mod.

26. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают MAdCAM, где:

(a) тяжелая цепь содержит аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи эталонного антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod,

(b) легкая цепь содержит аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи эталонного антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod,

(c) антитело содержит тяжелую цепь согласно (a) и легкую цепь согласно (b); и

(d) антитело согласно (c), где аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи выбраны из одного и того же эталонного антитела.

27. Моноклональное антитело или антигенсвязывающая часть по п.26, где тяжелая цепь, легкая цепь или обе из них содержат аминокислотную последовательность от начала CDR1 до конца CDR3 тяжелой цепи, легкой цепи или обеих из них, соответственно, эталонного антитела.

28. Моноклональное антитело или антигенсвязывающая часть по п.26, где

указанное антитело содержит:

(а) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2 (SEQ ID NO: 2); 1.8.2 (SEQ ID NO: 6); 6.14.2 (SEQ ID NO: 10); 6.22.2 (SEQ ID NO: 14); 6.34.2 (SEQ ID NO: 18); 6.67.1 (SEQ ID NO: 22); 6.73.2 (SEQ ID NO: 26); 6.77.1 (SEQ ID NO: 30); 7.16.6 (SEQ ID NO: 34); 7.20.5 (SEQ ID NO: 38); 7.26.4 (SEQ ID NO: 42); и 9.8.2 (SEQ ID NO: 46); X481.2 (SEQ ID NO: 148), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 52); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 56); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 60); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 64); и 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 42);

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность вариабельной легкой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2 (SEQ ID NO: 4); 1.8.2 (SEQ ID NO: 8); 6.14.2 (SEQ ID NO: 12); 6.22.2 (SEQ ID NO: 16); 6.34.2 (SEQ ID NO: 20); 6.67.1 (SEQ ID NO: 24); 6.73.2 (SEQ ID NO: 28); 6.77.1 (SEQ ID NO: 32); 7.16.6 (SEQ ID NO: 36); 7.20.5 (SEQ ID NO: 40); 7.26.4 (SEQ ID NO: 44); и 9.8.2 (SEQ ID NO: 48); X481.2 (SEQ ID NO: 150), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 54); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 58); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 62); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 66); и 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 68); или

(с) тяжелую цепь согласно (а) и легкую цепь согласно (b).

29. Моноклональное антитело по любому из п.п.1-13 и 18-28, которое представляет собой молекулу иммуноглобулина G (IgG), IgM, IgE и IgA или IgD, гуманизированное антитело, химерное антитело или биспецифическое антитело.

30. Антигенсвязывающая часть по любому из п.п.1-13, 18-20 и 22-29, которая представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, FV-фрагмент или одноцепочечное антитело.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-13 и 18-30 и фармацевтически приемлемый носитель.

32. Способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий стадию введения указанному индивидууму моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-13 и 18-30, где указанное антитело или антигенсвязывающая часть ингибирует связывание MAdCAM с $\alpha_4\beta_7$.

33. Способ по п.32, где воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта.

34. Способ по п.33, где воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, дивертикулеза, гастрита, заболевания печени, первичного билиарного склероза и склерозирующего холангита.

35. Способ по п.33, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона, язвенный колит или оба из них.

36. Способ по п.33, где воспалительное заболевание представляет собой инсулинзависимый диабет и реакцию "трансплантат против хозяина".

37. Выделенная клеточная линия, которая продуцирует моноклональное антитело

или антигенсвязывающую часть по любому из п.п.1-13 и 18-30, или тяжелую цепь или легкую цепь указанного антитела или указанной его части.

38. Клеточная линия по п.17 или 37, которая продуцирует антитело, выбранное из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2 и X481.2, или антитело, содержащее аминокислотные последовательности одного из указанных антител.

39. Клеточная линия по п.38, которая продуцирует моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из: 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod, 7.26.4-mod и X481.2, или антитело, содержащее аминокислотные последовательности одного из указанных антител.

40. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть или легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела по любому из п.п.1-13 и 18-30.

41. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.40, где вектор необязательно содержит последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с молекулой нуклеиновой кислоты.

42. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.41 или молекулу нуклеиновой кислоты по п.40.

43. Клетка-хозяин по п.42, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела, или антигенсвязывающую часть по любому из п.п.1-3 и 5-17.

44. Способ получения моноклонального антитела человека или его антигенсвязывающей части, которые специфически связывают MAdCAM, включающий культивирование клетки-хозяина по п.42 или 43 или клеточной линии по любому из п.п.15-17 или 38 в подходящих условиях и выделение указанного антитела или антигенсвязывающей части.

45. Не являющееся человеком трансгенное животное или трансгенное растение, содержащее

(а) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть;

(b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть; или

(с) как (а), так и (b) антитела,

где не являющееся человеком трансгенное животное или трансгенное растение экспрессирует указанную тяжелую цепь, или легкую цепь, или обе из них.

46. Способ выделения антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с MAdCAM, включающий стадию выделения антитела из не являющегося человеком трансгенного животного или трансгенного растения по п.45.

47. Способ лечения индивидуума, нуждающегося в этом, посредством антитела человека или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с MAdCAM и ингибируют связывание с $\alpha_4\beta_7$, включающий стадии:

(а) введения эффективного количества выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или молекул нуклеиновых кислот, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь или их антигенсвязывающие части; и

(b) экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты.

48. Способ продуцирования моноклонального антитела человека, которое специфически связывает MAdCAM, включающий стадии:

(а) иммунизации не являющегося человеком трансгенного животного, которое способно продуцировать антитела человека, посредством MAdCAM, иммуногенной частью MAdCAM или клеткой или тканью, экспрессирующей MAdCAM; и

(b) позволения трансгенному животному индуцировать иммунный ответ на MAdCAM.

49. Моноклональное антитело человека, продуцированное способом по п.48.

50. Способ ингибирования связывания $\alpha_4\beta_7$ с клетками, экспрессирующими MAdCAM человека, включающий приведение клеток в контакт с моноклональным антителом по любому из п.п.1-13 и 18-30 или его антигенсвязывающей частью.

51. Способ ингибирования опосредуемой MAdCAM адгезии лейкоцит-эндотелиальная клетка, включающий приведение в контакт эндотелиальных клеток с моноклональным антителом по любому из п.п.1-13 и 18-30 или его антигенсвязывающей частью.

52. Способ ингибирования опосредуемой MAdCAM адгезии, миграции и инфильтрации лейкоцитов в ткани, включающий стадию приведения в контакт эндотелиальных клеток с моноклональным антителом по любому из п.п.1-13 и 18-30 или его антигенсвязывающей частью.

53. Способ ингибирования зависимой от $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM клеточной адгезии, включающий стадию приведения в контакт клеток, экспрессирующих MAdCAM человека, с моноклональным антителом по любому из п.п.1-13 и 18-30 или его антигенсвязывающей частью.

54. Способ ингибирования опосредуемого MAdCAM привлечения лимфоцитов в желудочно-кишечную лимфоидную ткань, включающий стадию приведения в контакт клеток, экспрессирующих MAdCAM человека, с моноклональным антителом по любому из п.п.1-13 или его антигенсвязывающей частью.

55. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают MAdCAM, где указанное антитело или его часть содержат одну или несколько из аминокислотных последовательностей FR1, FR2, FR3 или FR4 моноклонального антитела человека, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2,

6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod.

56. Моноклональное антитело человека или антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело содержит:

(а) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod;

(b) аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, X481.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod и 7.26.4-mod;

(с) как (а), так и (b); или

(d) любую из (а), (b) или (с), с сигнальной последовательностью или без нее.

57. Способ диагностики нарушения, характеризующегося циркулирующим растворимым MAdCAM человека, включающий стадии: (1) приведения в контакт биологического образца с моноклональным антителом по любому из п.п.1-13 и 18-30 или антигенсвязывающей частью, и (2) детекции связывания.

58. Способ обнаружения воспаления у индивидуума, включающий стадии: (1) введения указанному индивидууму моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, где указанное антитело или его часть являются мечеными поддающейся детекции меткой, и (2) детекции связывания.

59. Диагностический набор, содержащий моноклональное антитело по любому из п.п.1-13 и 18-30 или антигенсвязывающую часть.

60. Фармацевтическая композиция по п.18, дополнительно содержащая одно или несколько дополнительных противовоспалительных или иммуномодулирующих средств.

61. Фармацевтическая композиция по п.60, где одно или несколько дополнительных противовоспалительных или иммуномодулирующих средств выбраны из группы, состоящей из: кортикостероидов, аминосалицилатов, азатиоприна, метотрексата, циклоспорина, FK506, IL-10, GM-CSF, рапамицина, средств, направленных против TNF α , и антагонистов молекул адгезии.

62. Вакцина, содержащая эффективное количество антитела человека по любому из п.п.1-13 и 18-30 или его антигенсвязывающей части и фармацевтически приемлемый носитель.

63. Вакцина по п.62, где вакцина является мукозальной.

64. Способ определения эффекта введения ингибиторного антитела против MAdCAM или его антигенсвязывающей части индивидууму, включающий стадии: (а) введения индивидууму моноклонального антитела человека, которое специфически

связывается с MAdCAM; и (b) определения того, происходит ли повышение уровней циркулирующих экспрессирующих $\alpha_4\beta_7$ лейкоцитов.

65. Способ по п.64, где указанные лейкоциты представляют собой лимфоциты.

66. Способ по п.64, где указанное повышение уровней циркулирующих $\alpha_4\beta_7$ -экспрессирующих лейкоцитов определяют посредством FACS-анализа.

67. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связывают MAdCAM, содержащие переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 150 и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 148.

68. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают MAdCAM, включающие переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидной SEQ ID NO: 149, и переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидной SEQ ID NO: 35.

По доверенности

ФИГ.1А

CDR1

CDR2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL

Тяжелая цепь 1.7.2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFTNAWMIWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL

Тяжелая цепь 1.8.2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVVSGFTFTNAWMIWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL

CDR3

Продукт VH3-15 QMNSLKTEDTAVYYCTT- -VA-DYWGQGLVTVSSA

Тяжелая цепь 1.7.2 QMNSLKTEDTAVYYCTTGGVAEDYWGQGLVTVSSA

Тяжелая цепь 1.8.2 QMNSLKTEDTAVYYCTTGGVAEDYWGQGLVTVSSA

ФИГ.1В

CDR1

CDR2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM

Тяжелая цепь 6.14.2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNNSAMTWVRQAPGKGLEWVSTTSGSGGTYYADSVKGRFTISRDSPKNTLYLQM

CDR3

Продукт VH-3-23 NSLRAEDTAVYYCAA-GYSYG-----YWGQGLVTVSSA

Тяжелая цепь 6.14.2 NSLRAEDTAVYYCAARGYSYGTTPYEYWGQGLVTVSSA

ФИГ.1С

Продукт VH3-33	CDR1	CDR2
Тяжелая цепь 6.22.2	<u>SYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u>	<u>VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u>
	<u>SKNTLYLQ</u>	
Продукт VH3-33	CDR3	
Тяжелая цепь 6.22.2	<u>MNSLRAEDTAVYYCAR</u>	<u>---YYYGMDVWGQGTTVTVSSA</u>
	<u>MNSLRAEDTAVYYCARD</u>	<u>PGYYYGMDVWGQGTTVTVSSA</u>

ФИГ.1D

Продукт VH3-30	CDR1	CDR2
Тяжелая цепь 6.34.2	<u>SYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u>	<u>VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u>
	<u>SKNTLYLQ</u>	
Продукт VH3-30	CDR3	
Тяжелая цепь 6.34.2	<u>MNSLRAEDTAVYYCAR</u>	<u>---TVVTYYYYGMDVWGQGTTVTVSSA</u>
	<u>MNSLSAEDTAVYYCARD</u>	<u>STAITYYYYGMDVWGQGTTVTVSSA</u>

ФИГ.1Е

Продукт VH4-4

CDR1

CDR2

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTSSGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKL

Тяжелая цепь 6.67.1

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSNYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTSGGTNSNPSLRGRVTILADTSKNQFSLKL

CDR3

Продукт VH4-4

SSVTAADTAVYYCAR--ITMVRGVI---FDYWGQGT

Тяжелая цепь 6.67.1

SSVTAADTAVYYCARDRITIRGLIPSFFDYWGQGTLVTVSSA

ФИГ.1F

Продукт VH3-23

CDR1

CDR2

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN

Тяжелая цепь 6.73.2

SKNTLYLQ EVQLLES GGDVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMNWVRQAPGKGLEWVSVISGRGGTTYADSVKGRFTISRDN

CDR3

Продукт VH3-23

MNSLRAEDTAVYYCA-IAVA----YYYYGMDVWGQGT

Тяжелая цепь 6.73.2

MNSLRAEDAAVYYCAKIAVAGEGLYYYYGMDVWGQGT

ФИГ.1G

Продукт VH3-21	CDR1	CDR2
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN		
Тяжелая цепь 6.77.1		
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN		
	CDR3	
Продукт VH3-21	SLRAEDTAVYYCAR-GYSSGW-YYYYYGMDVWGQGTTVTVSSA	
Тяжелая цепь 6.77.1	SLRAEDTAVYYCARDGYSSGWSYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSA	

ФИГ.1H

Продукт VH1-18	CDR1	CDR2
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYME		
Тяжелая цепь 7.16.6		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGINWVRQAPGQGLEWMGWISVYSGNTNYAQKVQGRVTMTADTSTSTAYMD		
Тяжелая цепь 7.26.4		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTSYGIDWVRQAPGQGLEWMGWISVYSGNTNYAQKLQGRVTMSTDSTSTAYME		
	CDR3	
Продукт VH1-18	LRSLRSDDTAVYYCAR--SSSS--YYYGMDVWGQGTTVTVSSA	
Тяжелая цепь 7.16.6	LRSLRSDDTAVYYCAREGSSSSSGDYGGMDVWGQGTTVTVSSA	
Тяжелая цепь 7.26.4	LRSLRSDDTAVYYCAREGSSSSSGDYGGMDVWGQGTTVTVSSA	

ФИГ.1I

Продукт VH4-4	CDR1	CDR2
Тяжелая цепь 7.20.5		
	CDR3	
Продукт VH4-4		
Тяжелая цепь 7.20.5		

ФИГ.1J

Продукт VH3-33	CDR1	CDR2
Тяжелая цепь 9.8.2		
	CDR3	
Продукт VH3-33		
Тяжелая цепь 9.8.2		

ФИГ.1K

		CDR1	CDR2
Продукт А3		DIVMTQSP LSLPV TPGEPASISCRSSQSL LQ SNGYNYLDWYLQKPGQSPQ LLIYL GSN NRAS GV PDR FSG	
Цепь каппа 1.7.2		DIVMTQSP LSLPV TPGEPASISCRSSQSL LQ SNGYNYLDWYLQKPGQSPQ LLIYL GSN NRAS GV PDR FSG	
Цепь каппа 1.8.2		DIVMTQSP LSLPV TPGEPASISCRSSQSL LQ SNG F NYLDWYLQKPGQSPQ LLIYL GSN NRAS GV PDR FSG	
		CDR3	
Продукт А3		SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTITFGQGTRLEIKR	
Цепь каппа 1.7.2		SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTITFGQGTRLEIKR	
Цепь каппа 1.8.2		SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTITFGQGTRLEIKR	

ФИГ.1L

		CDR1	CDR2
Продукт О12		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIFAASSLQSGVPSRFSGS	
Цепь каппа 6.14.2		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIF FV SSLQSGVPSRFSGS	
		CDR3	
Продукт О12		GS GT DFTLTIS SL QPEDFATYYCQ Q SYSTP-TFGQGTRLEIKR	
Цепь каппа 6.14.2		GS GT DFTLTIS SL QPEDFATYYCQ Q NYI P PTITFGQGTRLEIRR	

ФИГ.1M

		CDR1	CDR2
Продукт А26		EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSS L HWYQQKPDQSPKLLIKYASQSF T GVPSRFSGS	
Цепь каппа 6.22.2		EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQRI G SS L HWYQQKPDQSPKLLIKYASQSF S GVPSRFSGS	
		CDR3	
Продукт А26		GS GT DFTLTINSLEAEDAATYYCHQSS L --TFGGGTKVEIKR	
Цепь каппа 6.22.2		GS GT NFTLTINGLEAEDAATYYCHQSG R L P LTFGGGTKVEIKR	

ФИГ.1N

		CDR1	CDR2
Продукт 012		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLSQGVPSRFSGS	
Цепь каппа 6.34.2		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQNISSYLNWFQQKPGKAPKLLIYAASGLKRGVPSRFSGS	
		CDR3	
Продукт 012		SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKR	
Цепь каппа 6.34.2		SGTDFTLTIRTLQDDFATYSCHQSYSLPFTFGPGTKVDIKR	

ФИГ.1O

	CDR1	CDR2
Продукт B3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG	
Цепь каппа 6.67.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKTYLAWYQQKPRQPPKLLIYWASIREYGVPDRFSGSG	
	CDR3	
Продукт B3	SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP-LTFGGGTKVEIKR	
Цепь каппа 6.67.1	SGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQYYSIPLTFGGGTKVEIKR	

ФИГ.1Р

	CDR1	CDR2
Продукт 012	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS	
Цепь каппа 6.73.2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQNI TNY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLPRGVPSRFRGSGS	
	CDR3	
Продукт 012	GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP----FGQGTTLDIKR	
Цепь каппа 6.73.2	GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSNPPECGFGQGTTLDIKR	

ФИГ.1Q

	CDR1	CDR2
Продукт A2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS NR FSGVPDRFSGS	
Цепь каппа 6.77.1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCNSSQSLLLSDGKTYLNWYLQKPGQPPQLLIYEVS NR FSGVPDRFSGS	
	CDR3	
Продукт A2	GS GT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQL---FGQGTKLEIKR	
Цепь каппа 6.77.1	GS GT DFTLKISRVEAEDVGVYSCMQSIQLMCSFGQGTKLEIKR	

ФИГ.1R

	CDR1	CDR2
Продукт A2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS NR FSGVPDRFSGS	
Цепь каппа 7.16.6	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHTDGTTLYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS NR FSGVPDRFSGS	
Цепь каппа 7.26.4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSNQSLLYSDGKTYLFWYLQKPGQPPQLLIYEVS NR FSGVPDRFSGS	
	CDR3	
Продукт A2	GS GT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPWTFGQGTKVEIKR	
Цепь каппа 7.16.6	GS GT DFTLKISRVEAEDVGIYYCMQNIQLPWTFGQGTKVEIKR	
Цепь каппа 7.26.4	GS GT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPWTFGQGTKVEIKR	

ФИГ.1S

		CDR1	CDR2
Продукт A3		DIVMTQSP LSLPVTPGEPASIS CRSSQSL LHGNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL GSNRASGVPDRFSG	
Цепь каппа 7.20.5		DIVMTQSP LSLPVTPGEPASIS CRSSQSL LHGNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL GSNRASGVPDRFSG	
		CDR3	
Продукт A3		SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLTFGGGTKVEIKR	
Цепь каппа 7.20.5		SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLTFGGGTKVEIKR	

ФИГ.1T

		CDR1	CDR2
Продукт O18		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGS	
Цепь каппа 9.8.2		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGS	
		CDR3	
Продукт O18		GS GT DFTFTISSLQPED IATYYCQ QYDNL-ITFGQGTRLEIKR	
Цепь каппа 9.8.2		GS GT DFTFTISSLQPED IATYSCQ HSDNLSITFGQGTRLEIKR	

ФИГ.2А

```

1.7.2      --MRLPAQLLGLLMLWVS--GSSGDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLQS-NGY
1.8.2      --MRLPAQLLGLLMLWVS--GSSGDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLQS-NGF
7.20.5     --MRLPAQLLGLLMLWVS--GSSGDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHG-NGY
7.16.6     --MRLPAQLLGLLMLWIP--GSSADIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHT-DGT
7.26.4     --MRLPAQLLGLLMLWIP--GSSADIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSNQSLLYS-DGK
6.77.1     --MRLPAQLLGLLMLWIP--GSSADIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCNSSQSLLLS-DGK
6.67.1     --MVLQQTQVFISLLLWIS--GAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK
6.34.2     MDMRVPAQLLGLLLLLWLR--GARCDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQNissy----
6.73.2     MDMRVPAQLLGLLLLLWLR--GARCDIQMTQSPSSL SASVGDRVTFTCRASQNITNY----
6.14.2     MDMRVPAQLLGLLLLLWLR--GARCDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASRSissy----
9.8.2      MDMRVPAQLLGLLLLWL SVAGARCDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCQASQDISNY----
6.22.2     ---MLPSQLIGFLLLWVP--ASRGEIVLTQSPDFQSVTPKEKV TITCRASQRIGSS----
           : *:: *::*:   : : * :***:   : : : : * : : : :

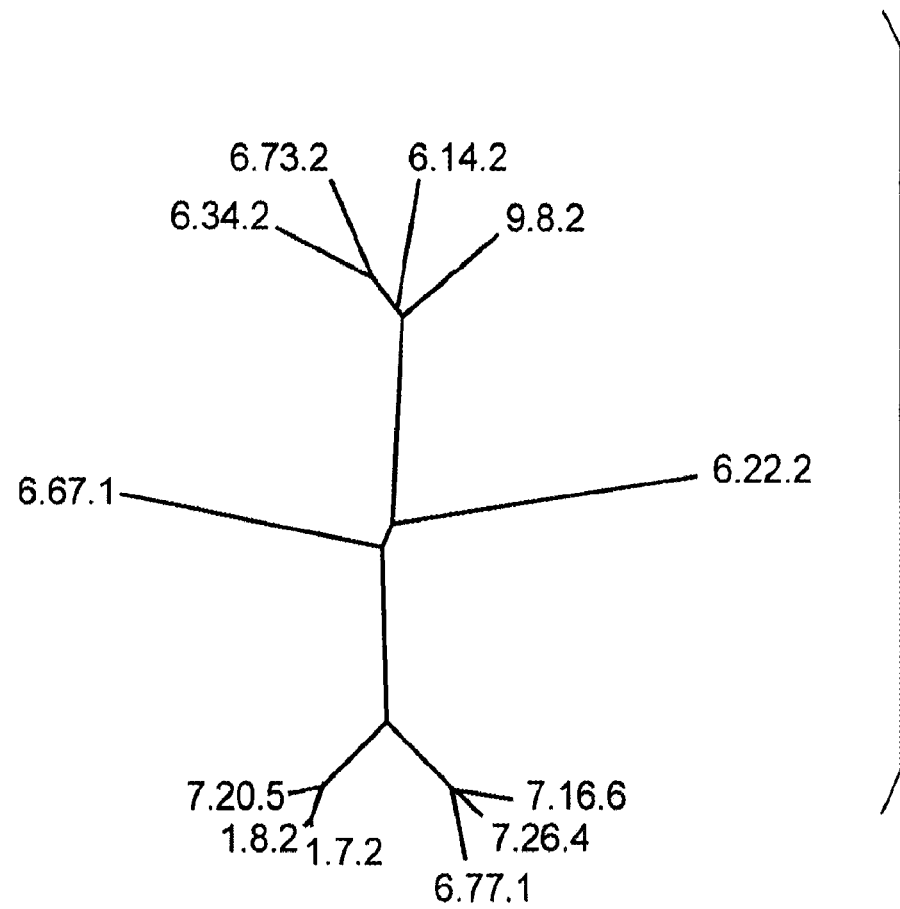
```

1.7.2	NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQ
1.8.2	NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQ
7.20.5	NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQ
7.16.6	TYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYCMQ
7.26.4	TYLFWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQ
6.77.1	TYLNWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYSCMQ
6.67.1	TYLAWYOOKPROPPKLLIYWASIREYGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLOAEDVAVYFCQQ

ФИГ.2А (продолжение)

6.34.2	--LNWFQQKPGKAPKLLIYAASGLKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTIRTLPDDFATYSCHQ
6.73.2	--LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLPRGVPSRFRGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
6.14.2	--LNWYQQKPGKAPKVLIFVSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
9.8.2	--LNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYSCQH
6.22.2	--LHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTNFTLTINGLEAEDAATYYCHQ
	* *: *** :.*:.* * ***.* *****:*. * :.:* . * * :
1.7.2	ALQT---ITFGQGTRLEIKR
1.8.2	ALQT---ITFGQGTRLEIKR
7.20.5	ALQT---LTFGGGTKVEIKR
7.16.6	NIQLP--WTFGQGTKVEIKR
7.26.4	SIQLP--WTFGQGTKVEIKR
6.77.1	SIQLM--CSFGQGTKLEIKR
6.67.1	YYSIPP-LTFGGGTKVEIKR
6.34.2	SYSLP--FTFGPGTKVDIKR
6.73.2	SYSNPPECFGQGTTLDIKR
6.14.2	NYIPP--ITFGQGTRLEIRR
9.8.2	SDNLS--ITFGQGTRLEIKR
6.22.2	SGRLP--LTFGGGTKVEIKR
	** ** :.*:*

ФИГ.2А (продолжение)



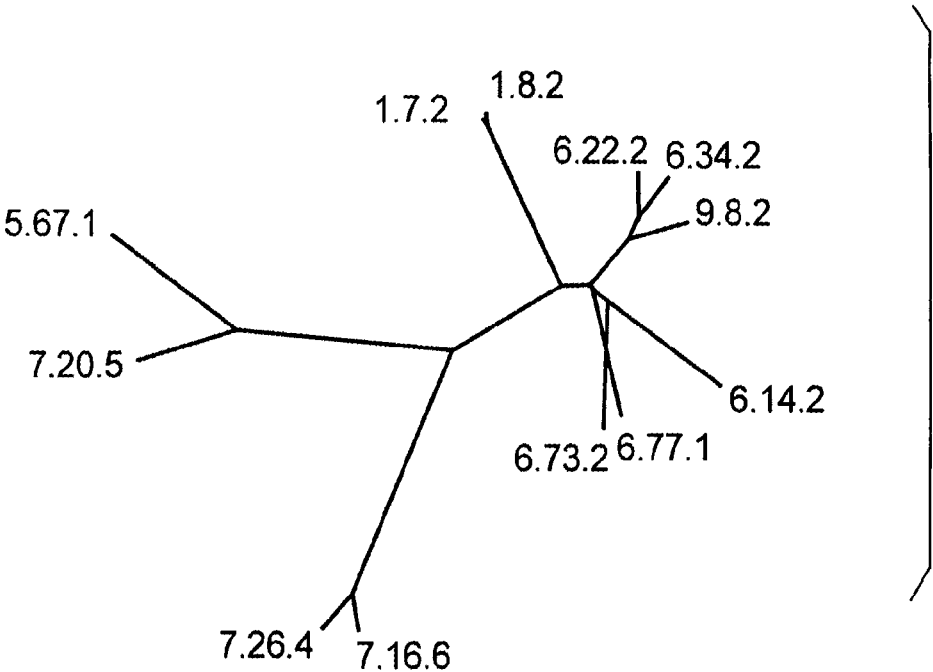
ФИГ.2В

7.16.6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGINWVRQAPGQGLEWMGWIS--VYSGNT
7.26.4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTSYGIDWVRQAPGQGLEWMGWIS--VYSGNT
1.7.2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFTNAWMIWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGGTT
1.8.2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVVS GFTFTNAWMIWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGGTT
6.14.2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNNSAMTWVRQAPGKGLEWVSTTS--GSGGTT
6.73.2	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMNWVRQAPGKGLEWVSVIS--GRGGTT
6.77.1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS--SSSSYI
6.22.2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGHTFSSDGMHWVRQAPGKGLEWVAIIW--YDGSNK
6.34.2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIS--NDGNNK
9.8.2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW--YDGSNE
7.20.5	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGSSISSYHWNWIRQPAGKGLEWIGRIY---TSGST
6.67.1	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGDSISSNYWSWIRQPAGKGLEWIGRIY---TSGGT
	:*** :** : :*. :: :* .* :: . *:*..*:****:.. ..
7.16.6	NYAQKVQGRVTMTADTSTSTAYMDLRSLRSDDTAVYYCAREG-SS--SSGDYYYGMDVWG
7.26.4	NYAQKLQGRVTMSTDTSTSTAFFLLRSLRSDDTAVYYCAREG-SS--SSGDYYYGMDVWG
1.7.2	DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGG-----VAEDY-----WG
1.8.2	DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGG-----VAEDY-----WG
6.14.2	YYADSVKGRFTISRDSPKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARG-YSYGTTPEY-----WG
6.73.2	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKIA-VAGEGLYYYYG-MDVWG
6.77.1	YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDG-YSSGWSYYYYYGM DVWG
6.22.2	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD-----PGYYYYG-MDVWG
6.34.2	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLSAEDTAVYYCARDS-TA--ITYYYYYG-MDVWG
9.8.2	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG-----AYH-FAYWG
7.20.5	NYNPSLKS RVTMSLDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGVRYYYYASGSYYYGLDVWG

ФИГ.2В (продолжение)

6.67.1	NSNPSLRGRVTILADTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD--RITIIRGLIPSFFDYWG :::*.*: * ... : : *: : *:*****: **
7.16.6	QGTTVTVSSA
7.26.4	QGTTVTVSSA
1.7.2	QGTLVTVSSA
1.8.2	QGTLVTVSSA
6.14.2	QGTLVTVSSA
6.73.2	QGTTVTVSSA
6.77.1	QGTTVTVSSA
6.22.2	QGTTVTVSSA
6.34.2	QGTTVTVSSA
9.8.2	QGTLVTVSSA
7.20.5	QGTTVTVSSA
6.67.1	QGTLVTVSSA *** *****

ФИГ.2В (продолжение)



ФИГ.3

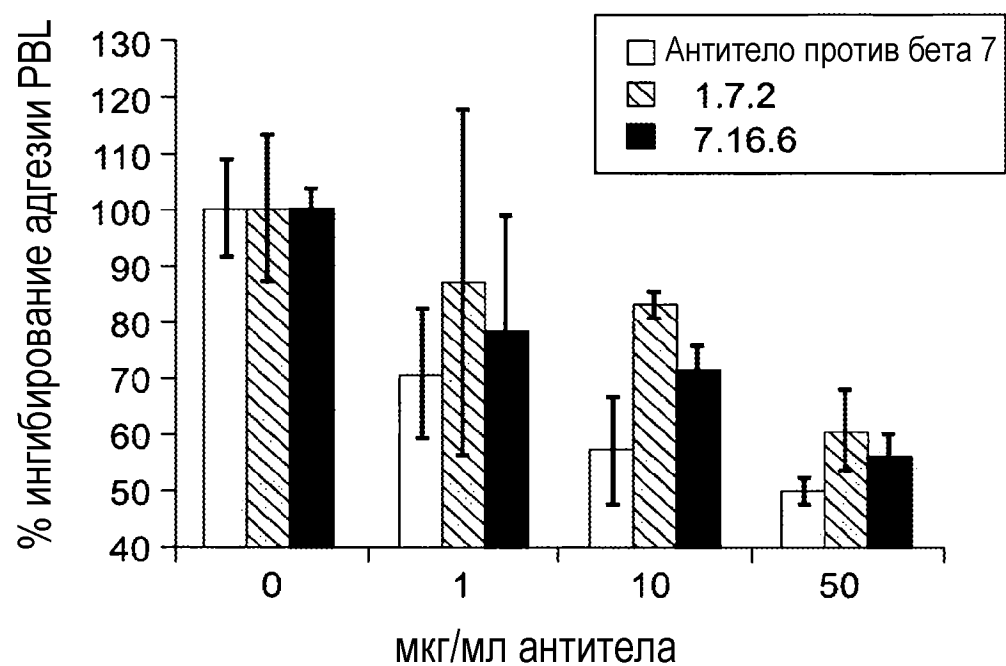
Домен 1

		<u>A</u>	<u>A'</u>	<u>B</u>	
MAdCAM яванского макака	MDRGLALLLAGLLGLLQPGCGQSLQVKPLQVEPPEPVVAVALGASRQLTCRLDCADGGAT				
MAdCAM человека	MDFGLALLLAGLLGLLL--GQSLQVKPLQVEPPEPVVAVALGASRQLTCRLACADRGAS				
	** ***** ***** ** **;				
	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>
MAdCAM яванского макака	VQWRGLDTSLGAVQSDAGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGSCGGRTFQHTVRLLVYAFPDQ				
MAdCAM человека	VQWRGLDTSLGAVQSDTGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGSCGGRTFQHTVQLLVYAFPDQ				
	*****:*****:*****				

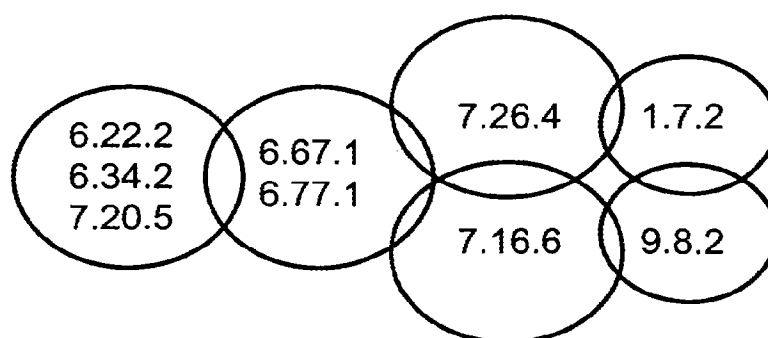
Домен 2

	<u>A</u>	<u>A'</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>C'</u>	<u>D</u>
MAdCAM яванского макака	LTISPAALVPGDPEVACTAHKVTPVDPNALSFSLLLGDQELEGAQALGPEVEEEEE-PQE					
MAdCAM человека	LTVSPAALVPGDPEVACTAHKVTPVDPNALSFSLLVGGQELEGAQALGPEVQEEEEEPQG					
	** :*****:*.*****:**** **					
	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>			
MAdCAM яванского макака	EEDVLFVRVTERWRLPTLATPVLPALYCQATMRLPGLELSHRQAIPVLH					
MAdCAM человека	DEDVLFVRVTERWRLPPLGTPVPPALYCQATMRLPGLELSHRQAIPVLH					
	:*****.*.*** *****					

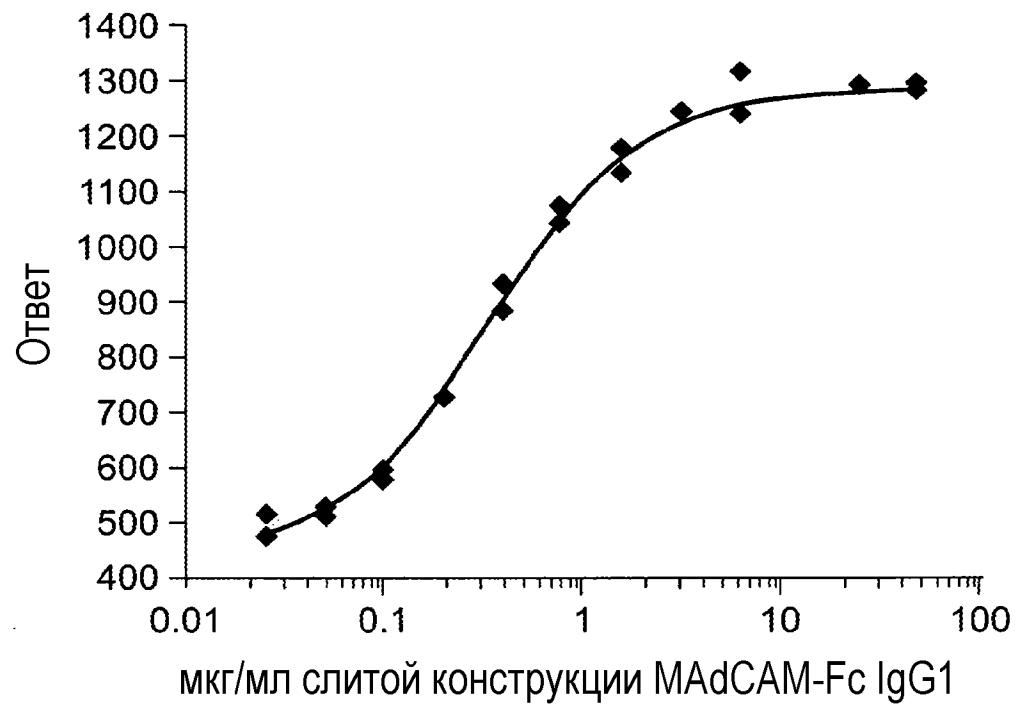
ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

