

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037071**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.02

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)

(21) Номер заявки
201300819

(22) Дата подачи заявки
2012.01.11

(54) **МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С IL-17A И IL-17F**

(31) **61/432,814**

(32) **2011.01.14**

(33) **US**

(43) **2014.01.30**

(86) **PCT/GB2012/050050**

(87) **WO 2012/095662 2012.07.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БАЙОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Адамс Ралф, Бейкер Теренс Соуард,
Лосон Аластэр Дейвид Гриффитс (GB)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2008047134**

**SCHIER R ET AL.: "EFFICIENT IN
VITRO AFFINITY MATURATION OF PHAGE
ANTIBODIES USING BIACORE GUIDED
SELECTIONS", HUMAN ANTIBODIES AND
HYBRIDOMAS, XX, XX, vol. 7, no. 3, 1 January
1996 (1996-01-01), pages 97-105, XP001002220,
abstract**

(57) В заявке описаны молекулы антител, которые обладают специфичностью в отношении антигенных детерминант как IL-17A, так и IL-17F, терапевтические применения молекул антител и способы получения указанных молекул антител.

B1

037071

037071

B1

Настоящее изобретение относится к молекулам антител, обладающим специфичностью в отношении таких антигенных детерминант как IL-17A, так и IL-17F. Настоящее изобретение относится также к терапевтическим применениям молекул антител и способам их получения.

IL-17A (первоначально обозначенный как CTLA-8 и известный также как IL-17) представляет собой провоспалительный цитокин, и он является первым описанным представителем семейства IL-17 (Rouvier и др., *J. Immunol.* 150, 1993, с. 5445-5456). Позднее были идентифицированы пять дополнительных представителей семейства (IL-17B - IL-17F), включая наиболее близкородственный IL-17F (ML-1), аминокислотная последовательность которого примерно на 55% гомологична аминокислотной последовательности IL-17A (Moseley и др., *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 2003, с. 155-174). IL-17A и IL-17F экспрессируются открытой в последнее время подпопуляцией Т-клеток-хелперов, связанной с аутоиммунитетом, а именно Th17-клетками, которые экспрессируют также "сигнатурные" цитокины IL-21 и IL-22 (Korn и др., *Annu. Rev. Immunol.* 27, 2009, с. 485-517). IL-17A и IL-17F экспрессируются в виде гомодимеров, но они могут экспрессироваться также в виде гетеродимера IL-17A/F (Wright и др., *J. Immunol.* 181, 2008, с. 2799-2805). IL-17A- и F передают сигналы через рецепторы IL-17R, IL-17RC или рецепторный комплекс IL-17RA/RC (Gaffen, *Cytokine* 43, 2008, сс. 402-407). Как IL-17A, так и IL-17F ассоциирован с рядом аутоиммунных заболеваний.

Таким образом, антагонисты IL-17A и IL-17F двойного действия могут оказаться более эффективными по сравнению с антагонистом однонаправленного действия при лечении опосредуемых IL-17 заболеваний. Антитела, которые связываются с IL-17A и IL-17F, описаны в WO 2007/106769, WO 2008/047134, WO 2009/136286 и WO 2010/025400.

В настоящем изобретении предложено улучшенное нейтрализующее антитело, которое обладает способностью связываться с высокой аффинностью как с IL-17A, так и с IL-17F. В частности, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, обладает способностью специфически связываться как с IL-17A, так и с IL-17F, т.е. антитело не связывается с другими изоформами IL-17. Предпочтительно антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается также с гетеродимером IL-17A/IL-17F. Предпочтительно антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нейтрализует активность как IL-17A, так и IL-17F. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нейтрализует также активность гетеродимера IL-17A/IL-17F. Таким образом, антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают преимуществом, заключающимся в том, что они обладают способностью ингибировать биологическую активность как IL-17A, так и IL-17F. Так, настоящее изобретение относится также к применению указанных антител для лечения и/или профилактики заболевания, связанного либо с любым одним, либо с обоими IL-17A и IL-17F, такого как аутоиммунное или воспалительное заболевание или рак.

В контексте настоящего описания понятие "нейтрализующее антитело" означает антитело, которое обладает способностью нейтрализовать связанную с передачей сигнала биологическую активность и IL-17A, и IL-17F, например путем блокады связывания IL-17A и IL-17F с одним или несколькими их рецепторами и путем блокады связывания гетеродимера IL-17A/IL-17F с одним или несколькими его рецепторами. Следует иметь в виду, что понятие "нейтрализация" в контексте настоящего описания относится к снижению связанной с передачей сигнала биологической активности, которое может быть частичным или полным. Кроме того, следует иметь в виду, что степень нейтрализации антителом активности IL-17A и IL-17F может быть одинаковой или различной. В одном из вариантов осуществления изобретения степень нейтрализации активности гетеродимера IL-17A/IL-17F может быть такой же, что и степень нейтрализации активности IL-17A или IL-17F, или она может отличаться от нее.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, специфически связываются с IL-17A и IL-17F. Понятие "специфически связываются" означает, что антитела обладают более высокой аффинностью в отношении полипептидов IL-17A и IL-17F (включая гетеродимер IL-17A/IL-17F), чем в отношении других полипептидов. Предпочтительно полипептиды IL-17A и IL-17F являются человеческими. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело связывается также с IL-17F обезьяны циномоглус (яванский макак-крабоед).

Полипептиды IL-17A или IL-17F или смесь их обоих, или клетки, экспрессирующие один или оба указанных полипептида, можно применять для получения антител, которые специфически распознают оба полипептида. Полипептиды IL-17 (IL-17A и IL-17F) могут представлять собой "зрелые" полипептиды или их биологически активные фрагменты или производные, которые предпочтительно включают сайт связывания рецептора. Предпочтительно полипептиды IL-17 представляют собой зрелые полипептиды. Полипептиды IL-17 можно получать с использованием процессов, хорошо известных в данной области, из созданных с помощью генной инженерии клеток-хозяев, которые содержат экспрессионные системы, или их можно выделять из встречающихся в естественных условиях биологических источников. В контексте настоящего описания понятие "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Если специально не указано иное, то их применяют взаимозаменяемо. Полипептид IL-17 может в некоторых случаях являться частью более крупного белка, такого как слитый белок, например, слитый с аффинной меткой белок. Антитела к указанным полипептидам можно получать, если для этого необходима иммунизация животного, путем введения полипептидов в животное, предпочтительно в животное кроме чело-

века, используя хорошо известные общепринятые протоколы (см., например, Handbook of Experimental Immunology, под ред. D.M. Weir, т. 4, изд-во Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Можно иммунизировать различных теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы или свиньи. Однако наиболее предпочтительными являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, включают полные антитела и их функционально активные фрагменты или производные и могут представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные, мультивалентные, мультиспецифические, биспецифические, гуманизированные или химерные антитела, доменные антитела, например, VH, VL, VHH, одноцепочечные антитела, Fv-, Fab-фрагменты, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты и эпитопсвязывающие фрагменты любой из указанных выше конструкций. Другие фрагменты антител включают фрагменты, описанные в международных заявках на патент WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171. Другие фрагменты антител включают Fab-Fv- и Fab-dsFv-фрагменты, описанные с WO 2009/040562 и WO 2010/035012 соответственно. Фрагменты антител и методы их получения хорошо известны в данной области (см., например, Verma и др., Journal of Immunological Methods, 216, 1998, сс. 165-181; Adair и Lawson, Therapeutic antibodies. Drug Design Reviews - Online 2(3), 2005, с. 209-217).

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, включают молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные участки молекул иммуноглобулинов, т.е. молекул, которые содержат антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с антигеном. Молекулы иммуноглобулинов, предлагаемые в изобретении, могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

Моноклональные антитела можно получать с помощью любого метода, известного в данной области, такого как метод гибридом (Kohler и Milstein, Nature, 256, 1975, с. 495-497), метод триом, метод человеческих В-клеточных гибридом (Kozbor и др., Immunology Today, 4, 1983, с. 72) и метод EBV-гибридом (Cole и др., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, изд-во Alan R Liss, Inc., 1985, с. 77-96).

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью методов, основанных на использовании антител индивидуальных лимфоцитов, путем клонирования и экспрессии кДНК варибельных областей иммуноглобулинов, которые вырабатываются индивидуальными лимфоцитами, отобранными по признаку производства специфических антител, например с помощью методов, описанных у Babcock, J. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15), 1996, с. 7843-78481; в WO 92/02551; WO 2004/051268 и международной заявке на патент WO 2004/106377.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител из видов кроме человека, которые имеют один или несколько гиперварибельных участков (CDR) из видов, кроме человека, и каркасный участок из молекулы человеческого иммуноглобулина (см., например, US 5585089; WO 91/09967).

Химерные антитела представляют собой такие антитела, кодируемые генами иммуноглобулина, которые созданы с помощью генной инженерии таким образом, что гены легкой и тяжелой цепи состоят из сегментов генов иммуноглобулинов, принадлежащих к разным видам. Эти химерные антитела, вероятно, являются менее антигенными.

Бивалентные антитела можно получать методами, известными в данной области (Milstein и др., Nature 305, 1983, с. 537-539; WO 93/08829, Trautnecker и др., EMBO J. 10, 1991, с. 3655-3659). Мультивалентные антитела могут обладать несколькими специфичностями или могут быть моноспецифическими (см., например, WO 92/22853 и WO 05/113605).

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно создавать также с помощью различных методов фагового дисплея, которые включают методы, описанные у Brinkman и др., J. Immunol. Methods, 182, 1995, с. 41-50), Ames и др., J. Immunol. Methods, 184, 1995, с.177-186), Kettleborough и др., Eur. J. Immunol., 24, 1994, с. 952-958), Persic и др., Gene, 187, 1997, с. 9-18), Burton и др., Advances in Immunology, 57, 1994, с. 191-280) и в WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; и US 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108. Методы получения одноцепочечных антител, например, описанные в US 4946778, можно адаптировать также для получения одноцепочечных антител, которые связываются с IL-17A и IL-17F. Кроме того, для экспрессии гуманизированных антител можно использовать трансгенных мышей или другие организмы, включая другие виды млекопитающих.

Скрининг антител можно осуществлять с использованием анализов, предназначенных для оценки связывания с человеческим IL-17A и человеческим IL-17F, например VISAcore™-анализов, которые представлены в разделе "Примеры" в настоящем описании. Приемлемые анализы нейтрализации известны в данной области (см., например, WO 2008/047134 и раздел "Примеры" в настоящем описании).

Остатки в варибельных областях антитела, как правило, нумеруют согласно номенклатуре Кэбота с соавторами. Эта номенклатура описана у Kabat и др., 1987 в: Sequences of Proteins of Immunological Interest, изд-во US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее "Кэбот и др., выше"). В настоящем описании использовали указанную систему нумерации, если специально не указано иное.

Нумерация остатков по Кэботу не всегда соответствует непосредственно линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать

меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты по сравнению с нумерацией строго по Кэботу, что соответствует укорочению структурного компонента или встраиванию в структурный компонент, представляющий собой либо каркасный, либо гипервариабельный участок (CDR) основной структуры вариабельной области. Правильную нумерацию по Кэботу остатков можно определять для данного антигена путем сравнительного анализа гомологии остатков в последовательности антигена и "стандартной", пронумерованной по Кэботу последовательности.

Согласно номенклатуре Кэбота CDR вариабельной области тяжелой цепи локализованы на остатках 31-35 (CDR-H1), остатках 50-65 (CDR-H2) и остатках 95-102 (CDR-H3). Однако согласно номенклатуре Хотиа (Chothia C. и Lesk A.M., J. Mol. Biol., 196, 1987, с. 901-917) петля, эквивалентная CDR-H1, простирается от остатка 26 до остатка 32. Таким образом, в контексте настоящего описания "CDR-H1" содержит остатки 26-35, что соответствует комбинации номенклатуры Кэбота и определения по Хотиа на основе топологии петли.

CDR вариабельной области легкой цепи локализованы на остатках 24-34 (CDR-L1), остатках 50-56 (CDR-L2) и остатках 89-97 (CDR-L3) согласно номенклатуре Кэбота.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является нейтрализующее антитело, обладающее специфичностью в отношении человеческого IL-17A и человеческого IL-17F, которое содержит легкую цепь, где вариабельная область легкой цепи содержит последовательность CDR-L1, представленную в SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, представленную в SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3, представленную в SEQ ID NO: 6 (см. фиг. 1в).

Молекулы антител, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно содержат комбинированную тяжелую цепь.

Таким образом, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является нейтрализующее антитело, обладающее специфичностью в отношении человеческого IL-17A и человеческого IL-17F, которое содержит также тяжелую цепь, где вариабельная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере один CDR, имеющий последовательность CDR-H1, представленную в SEQ ID NO: 1, CDR, имеющий последовательность CDR-H2, представленную в SEQ ID NO: 2, и CDR, имеющий последовательность CDR-H3, представленную в SEQ ID NO: 3 (см. фиг. 1в).

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является нейтрализующее антитело, обладающее специфичностью в отношении человеческого IL-17A и человеческого IL-17F, которое содержит тяжелую цепь, где по меньшей мере два из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 вариабельной области тяжелой цепи выбраны из следующих последовательностей: последовательность CDR-H1, представленная в SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, представленная в SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3, представленная в SEQ ID NO: 3. Например, антитело может содержать тяжелую цепь, в которой CDR-H1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и CDR-H2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. Альтернативно этому антитело может содержать тяжелую цепь, в которой CDR-H1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и CDR-H3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или антитело может содержать тяжелую цепь, в которой CDR-H2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и CDR-H3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3. Для того, чтобы избежать двусмысленности, следует отметить, что при этом включены все перестановки.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является нейтрализующее антитело, обладающее специфичностью в отношении человеческого IL-17A и человеческого IL-17F, которое содержит тяжелую цепь, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность CDR-H1, представленную в SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, представленную в SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3, представленную в SEQ ID NO: 3.

Согласно одному из вариантов осуществления антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность CDR-H1, представленную в SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, представленную в SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3, представленную в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, где вариабельная область легкой цепи содержит последовательность CDR-L1, представленную в SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, представленную в SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3, представленную в SEQ ID NO: 6.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой моноклональное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой молекулу антигена с трансплантированными CDR, содержащую каждый из CDR, представленных в SEQ ID NO: 1-6. В контексте настоящего описания понятие "молекула антигена с трансплантированными CDR" относится к молекуле антигена, в котором тяжелая цепь и/или легкая цепь содержит один или несколько CDR (включая при необходимости один или несколько модифицированных CDR) из антигена-донора (например, мышинного моноклонального антигена), трансплантированных в каркасный участок вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи антигена-акцептора, например человеческого антигена (см. обзор Vaughan и др., Nature Biotechnology, 16, 1998, сс. 535-539). В од-

ном из вариантов осуществления изобретения в каркасный участок человеческого антитела чаще переносят не полный CDR, а только один или несколько указанных выше определяющих специфичность остатков из любого указанного выше CDR (см., например, Kashmiri и др., *Methods*, 36, 2005, с. 25-34). В одном из вариантов осуществления изобретения в каркасный участок человеческого антитела переносят только определяющие специфичность остатки из одного или нескольких указанных выше CDR. В другом варианте осуществления изобретения в каркасный участок человеческого антитела переносят только определяющие специфичность остатки из каждого из указанных выше CDR.

Когда трансплантируют CDR или определяющие специфичность остатки, то можно использовать любую приемлемую последовательность каркасного участка варибельной области в зависимости от класса/типа антитела-донора, из которого выведены CDR, включая каркасные участки мышей, приматов и человека. Предпочтительно антитело с трансплантированными CDR, предлагаемое в настоящем изобретении, имеет варибельную область, которая содержит человеческие акцепторные каркасные участки, а также один или несколько указанных выше CDR или определяющих специфичность остатков. Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является нейтрализующее антитело с трансплантированными CDR, в котором варибельная область содержит человеческие акцепторные каркасные участки и CDR из нечеловеческого антитела-донора.

Примерами человеческих каркасных участков, которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat и др., выше). Например, KOL и NEWM можно применять для тяжелой цепи, REI можно применять для легкой цепи, а EU, LAY и POM можно применять как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно этому можно применять последовательности человеческих зародышевых линий, информацию о которых можно почерпнуть на сайте: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>.

В антителе с трансплантированными CDR, предлагаемом в настоящем изобретении, акцепторные тяжелые и легкие цепи необязательно могут быть выведены из одного и того же антитела, и при необходимости они могут содержать сложные цепи, имеющие каркасные участки, которые выведены из различных цепей.

Предпочтительный каркасный участок для тяжелой цепи антитела с трансплантированными CDR, предлагаемого в настоящем изобретении, выводят из последовательности 1-3 3-07 человеческой подгруппы VH3 в сочетании с JH4. Таким образом, изобретение относится к нейтрализующему антителу с трансплантированными CDR, содержащему по меньшей мере один нечеловеческий донорский CDR, в котором каркасный участок тяжелой цепи выводят из последовательности 1-3 3-07 человеческой подгруппы VH3 в сочетании с JH4. Последовательность человеческого JH4 представляет собой: (YFDY)WGQGTLVTVSS. Мотив YFDY является частью CDR-H3 и не является частью каркасного участка 4 (Ravetch J.V. и др., *Cell*, 27, 1981, с. 583-591).

Предпочтительный каркасный участок для легкой цепи антитела с трансплантированными CDR, предлагаемого в настоящем изобретении, выводят из последовательности 2-1-(1) L4 человеческой зародышевой линии подгруппы VK1 в сочетании с JK1, что описано ранее в WO 2008/047134. Таким образом, изобретение относится к нейтрализующему антителу с трансплантированными CDR, содержащему по меньшей мере один нечеловеческий донорский CDR, в котором каркасный участок легкой цепи выведен из последовательности человеческой подгруппы VK1 2-1-(1) L4 в сочетании с JK1. Последовательность JK1 представляет собой: (WT)FGQGTKVEIK. Мотив WT является частью CDR-L3 и не является частью каркасного участка 4 (Hieter P.A. и др., *J. Biol. Chem.*, 257, 1982, с. 1516-1522).

Кроме того, не является обязательным, чтобы в антителе с трансплантированными CDR, предлагаемом в изобретении, каркасные участки имели точно такую же последовательность, что и в акцепторном антителе. Например, наиболее редко встречающиеся остатки можно заменять на более часто встречающиеся остатки для конкретного класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно этому отобранные остатки в акцепторных каркасных участках можно заменять так, чтобы они соответствовали остатку, обнаруженному в этом же положении в донорском антителе (см. Reichmann и др., *Nature*, 332, 1998, с. 323-324). Указанные изменения должны быть минимально необходимыми для обеспечения аффинности, характерной для донорского антитела. Протокол выбора остатков в акцепторных каркасных участках, которые можно изменять, изложен в WO 91/09967.

Если в молекуле антитела с трансплантированными CDR, предлагаемой в настоящем изобретении, акцепторная тяжелая цепь имеет последовательность 1-3 3-07 человеческой подгруппы VH3 в сочетании с JH4, то предпочтительно акцепторные каркасные участки тяжелой цепи содержат помимо одного или нескольких донорских CDR донорский остаток, по меньшей мере, в положении 94 (согласно Кэботу и др., выше). Таким образом, в изобретении предложено антитело с трансплантированными CDR, в котором, по меньшей мере, остаток в положении 94 варибельной области тяжелой цепи представляет собой донорский остаток.

Если в молекуле антитела с трансплантированными CDR, предлагаемой в настоящем изобретении, акцепторная легкая цепь имеет последовательность 2-1-(1) L4 человеческой подгруппы VK1 в сочетании с JK1, то предпочтительно не осуществляют перенос никаких донорских остатков, т.е. переносят только CDR. Таким образом, в изобретении предложено антитело с трансплантированными CDR, в донорский

каркасный участок которого перенесены только CDR.

Донорские остатки представляют собой остатки из донорского антитела, т.е. антитела, из которого первоначально получены CDR.

При создании настоящего изобретения антитело, известное как CA 0280496 (которое описано ранее в WO 2008/047134), усовершенствовали путем замены пяти остатков в легкой цепи. Три остатка находились в CDR-участках и два в каркасном участке. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения переменная область легкой цепи содержит остаток аргинина в положении 30, остаток серина в положении 54, остаток изолейцина в положении 56, остаток аспарагиновой кислоты в положении 60 и остаток аргинина в положении 72.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит легкую цепь, где переменная область легкой цепи содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 (gL7).

В другом варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит легкую цепь, где переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 96% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит легкую цепь, где переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 97, 98 или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 (gH9).

В другом варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, где переменная область содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В другом варианте осуществления изобретения антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 96% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. Предпочтительно антитело содержит тяжелую цепь, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 98% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, где переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

В контексте настоящего описания понятие "идентичность" означает, что в любом конкретном положении линейризованных последовательностей находится аминокислотный остаток, идентичный для обеих последовательностей. В контексте настоящего описания понятие "подобие" означает, что в любом конкретном положении линейризованных последовательностей в обеих последовательностях находится аминокислотный остаток подобного типа. Например, лейцин можно заменять изолейцином или валином. Другие аминокислоты, которые часто заменяют друг другом, включают (но, не ограничиваясь только ими):

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты с ароматическими боковыми цепями);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты с основными боковыми цепями);
- аспартат и глутамат (аминокислоты с кислотными боковыми цепями);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты, несущие амид в боковой цепи);
- цистеин и метионин (аминокислоты с содержащими серу боковыми цепями).

Степень идентичности и подобия можно легко рассчитывать (Computational Molecular Biology, под ред. Lesk A.M., изд-во Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, под ред. Smith D.W., изд-во Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, часть 1, под ред. Griffin A.M. и Griffin H.G., изд-во Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, под ред. Heinje G., изд-во Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, под ред. Gribskov M. и Devereux J., изд-во M Stockton Press, New York, 1991).

Молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, представляет собой молекулу полного антитела, имеющего полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или его фрагмент, такой как доменное антитело, например VH, VL, VHH, Fab-фрагмент, модифицированный Fab-фрагмент, Fab'-, F(ab')₂-, Fv- или scFv фрагмент. Другие фрагменты антитела включают Fab-Fv- и Fab-dsFv-фрагменты, описанные в WO

2009/040562 и WO 2010/035012 соответственно. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, выбирают из группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, scFv- и Fv-фрагмента.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, в частности указанные выше фрагменты антител, можно включать в другие форматы антител, в частности мультиспецифические антитела, такие как би- или триспецифические антитела, при этом одна из специфичностей соответствует антителу, предлагаемому в настоящем изобретении, т.е. специфичности в отношении IL-17A и IL-17F (включая гетеродимер IL-17A/F). Таким образом, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является мультиспецифическое антитело, которое содержит один или несколько фрагментов антител, указанных выше в настоящем описании.

Примерами мультиспецифических антител являются двух-, трех или четырехвалентные антитела, бис-scFv, димерные, тримерные, тетрамерные антитела, бибоди и трибоди (см, например, Holliger и Hudson, Nature Biotech 23(9), 2005, сс. 1126-1136; Schoonjans и др., Biomolecular Engineering, 17 (6), 2001, сс. 193-202). Другие мультиспецифические антитела включают Fab-Fv, Fab-dsFv, Fab-Fv-Fv-. Фрагменты Fab-Fv-Fc и Fab-dsFv-ПЭГ описаны в WO 2009/040562, WO 2010/035012, WO 2011/08609, WO 2011/030107 и WO 2011/061492 соответственно.

Домены константных областей молекулы антитела, предлагаемой в изобретении, если они присутствуют, можно выбирать, принимая во внимание предполагаемую функцию молекулы антитела, и прежде всего эффекторные функции, которые могут требоваться. Например, домены константных областей могут представлять собой домены человеческого IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В частности, можно применять домены константных областей человеческого IgG, прежде всего изотипов IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначена для терапевтических применений и требуются эффекторные функции антитела. Альтернативно этому можно применять изотипы IgG2 и IgG4, когда молекула антитела предназначена для терапевтических применений, но при этом не требуются эффекторные функции антитела, например, предназначена только для блокады активности IL-17. Можно применять также варианты последовательностей этих доменов константных областей. Например, можно применять молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 заменен на пролин, которые описаны у Angal и др., Molecular Immunology, 30 (1), 1993, с. 105-108. Наиболее предпочтительным является домен константной области IgG1. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, антитела можно подвергать также различным посттрансляционным модификациям. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, применяемых для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Указанные модификации могут включать варианты гликозилирования, окисления метионина, формирования дикетопиперазина, изомеризации аспартата и деаминарования аспарагина. Часто встречающейся модификацией является потеря карбоксиконцевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) под действием карбоксипептидаз (как это описано у Harris, R.J. Journal of Chromatography 705, 1995, с. 129-134). В результате C- концевой лизин в тяжелой цепи антитела, например, как это представлено на фиг. 2 (а), SEQ ID NO: 15, может отсутствовать.

В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит CH1-домен и легкая цепь антитела содержит CL-домен, либо каппа-, либо лямбда-цепи.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой нейтрализующее антитело, обладающее специфичностью в отношении человеческого IL-17A и человеческого IL-17F, в котором константная область тяжелой цепи содержит константную область человеческого IgG1. Таким образом, в настоящем изобретении предложено антитело, в котором тяжелая цепь содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 (см. фиг. 2а).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит тяжелую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15. Предпочтительно антитело содержит тяжелую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15.

В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит легкую цепь, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 (см. фиг. 1г).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит легкую цепь, где легкая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11. Предпочтительно антитело содержит легкую цепь, где легкая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11.

Одним из вариантов настоящего изобретения является антитело, в котором тяжелая цепь содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, и легкая цепь содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь,

где тяжелая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, и легкая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11. Предпочтительно антитело содержит тяжелую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 98% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, где легкая цепь содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 98% идентична или подобна последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11.

В любом объекте настоящего изобретения молекула антитела предпочтительно обладает высокой аффинностью к связыванию, предпочтительно находящейся на пиколярном уровне. Как должно быть очевидно, аффинность к связыванию антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с человеческим IL-17A может отличаться от аффинности к связыванию этого же антитела с человеческим IL-17F и/или гетеродимером IL-17A/F. Например, молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает более высокой аффинностью к IL-17A, чем аффинность к IL-17F. Например, молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает по меньшей мере в 5 раз более высокой аффинностью к IL-17A, чем ее аффинность к связыванию с IL-17F. Например, молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает такой же аффинностью к IL-17A, как и ее аффинность к IL-17F. Например, молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает аффинностью и к IL-17A, и к IL-17F, находящейся на пиколярном уровне.

Аффинность можно оценивать с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области, включая Viascore™, представленный в настоящем описании в разделе "Примеры", используя встречающийся в естественных условиях или рекомбинантный IL-17A и IL-17F, каждый из которых находится в виде гомодимера.

Предпочтительно молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17A, составляющей 50 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17A, составляющей 20 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17A, составляющей 10 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17A, составляющей 5 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17A, составляющей 3,2 пМ.

Предпочтительно молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17F, составляющей 100 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17F, составляющей 50 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, обладает аффинностью к связыванию IL-17F, составляющей 23 пМ.

Должно быть очевидно, что аффинность антител, предлагаемых в настоящем изобретении, можно изменять с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области. Таким образом, настоящее изобретение относится также к вариантам молекул антител, предлагаемых в настоящем изобретении, которые обладают улучшенной аффинностью к IL-17A и/или IL-17F. Такие варианты можно получать с помощью различных протоколов созревания аффинности, включая мутацию CDR (Yang и др., J. Mol. Biol., 254, 1995, сс. 392-403), перестановку цепи (Marks и др., Bio/Technology, 10, 1992, с. 779-783), применение штаммов-мутаторов E. coli (Low и др., J. Mol. Biol., 250, 1996, сс. 359-368), перестановку ДНК (Patten и др., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 1997, с. 724-733), фаговый дисплей (Thompson и др., J. Mol. Biol., 256, 1996, сс. 77-88) и ПЦР, предназначенную для получения гибридных молекул ДНК (Cramer и др., Nature, 391, 1998, сс. 288-291). У Vaughan и др. (выше) обсуждены указанные методы созревания аффинности.

При необходимости антитело, предназначенное для применения согласно настоящему изобретению, можно конъюгировать с одной или несколькими эффекторной(ми) молекулой(ми). Очевидно, что эффекторная молекула может представлять собой индивидуальную эффекторную молекулу или две или большее количество таких эффекторных молекул, сцепленных таким образом, что они образуют отдельный фрагмент, который можно присоединять к антителам, предлагаемым в настоящем изобретении. Если требуется применять фрагмент антитела, сцепленный с эффекторной молекулой, то его можно получать с помощью стандартных химических методов или методов рекомбинантной ДНК, при которых фрагмент антитела сцепляют либо непосредственно, либо через сшивающий агент с эффекторной молекулой. Методы конъюгации указанных эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см. Hellstrom и др., Controlled Drug Delivery, 2-ое изд., под ред. Robinson и др., 1987, с. 623-653; Thorpe и др., Immunol. Rev., 62, 1982, с. 119-158 и Dubowchik и др., Pharmacology and Therapeutics, 83, 1999, с. 67-123). Конкретные химические методики включают, например, описанные в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03031581. Альтернативно этому эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, для присоединения которого можно применять методы рекомбинантной ДНК, например методы, описанные в WO 86/01533 и EP 0392745.

Понятие "эффекторная молекула" в контексте настоящего описания включает, например, противоопухолевые вещества, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другие антитела или фрагменты антител, синтетические или встречающиеся в естественных условиях полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, прежде всего радиоiodид, радиоизотопы, хелатирующие металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые можно выявлять с помощью ЯМР-спектроскопии или спектроскопии электронного спинового резонанса (ESR).

Примерами эффекторных молекул могут являться цитотоксины или цитотоксические агенты, включая любой агент, который оказывает вредное воздействие на клетки (например, уничтожает их). Примерами являются комбрестатины, доластатиты, эпотилоны, стауреспорин, майтансиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохаластин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы представляют собой также (но, не ограничиваясь только ими) антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, тиотэпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфан, дибромоманнит, стрептозотин, митомицин С и цисдихлодиамин платины(II) (DDP, цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (прежнее название дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут представлять собой также молекулы хелатирующих радионуклидов, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут 213 , калифорний 252 , иридий 192 и вольфрам 188 /рений 188 ; или лекарственные средства, такие как (но, не ограничиваясь только ими) алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы представляют собой белки, пептиды и ферменты. Представляющие интерес ферменты включают (но, не ограничиваясь только ими) протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Представляющие интерес белки, полипептиды и пептиды включают (но, не ограничиваясь только ими) иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, ризин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромботический агент или антиангиогенный агент, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), колониестимулирующий фактор роста гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другие факторы роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать выявляемые субстанции, которые можно применять, например для диагностики. Примерами выявляемых субстанций являются, например, различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества, радиоактивные нуклиды, испускающие позитроны металлы (предназначенные для применения в позитронной эмиссионной томографии) и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов (см. общие сведения в US 4741900, касающиеся ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве средств диагностики). Приемлемыми ферментами являются пероксидаза из хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилюлинэстераза; приемлемыми простетическими группами являются стрептавидин, авидин и биотин; приемлемыми флуоресцентными веществами являются умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлотриазиниламин флуоресцеина, дансилхлорид и фикоэритрин; приемлемым люминесцентным веществом является люминол; приемлемыми биолюминесцентными веществами являются люцифераза, люциферин и экворин; а приемлемыми радиоактивными нуклидами являются ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

Другим примером эффекторной молекулы является молекула, которая может удлинять время полужизни антитела *in vivo*, и/или снижать иммуногенность антитела, и/или улучшать введение антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примерами приемлемых молекул этого типа являются полимеры, альбумин, альбуминсвязывающие белки или альбуминсвязывающие соединения, например, описанные в WO 05/117984.

Если эффекторная молекула представляет собой полимер, то она может, как правило, представлять собой синтетический или встречающийся в естественных условиях полимер, например необязательно замещенный прямоцепочечный или разветвленный полиалкиленовый, полиалкениленовый или полиоксипалиленовый полимер или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например гомо- или гетерополисахарид.

Конкретными необязательными заместителями, которые могут присутствовать в вышеуказанных син-

тетических полимерах, являются одна или несколько гидроксигрупп, металльных групп или метоксигрупп.

Конкретными примерами синтетических полимеров являются необязательно замещенный прямоцепочечный или разветвленный поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль), поли(виниловый спирт) или их производные, прежде всего необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Конкретными встречающимися в естественных условиях полимерами являются лактоза, амилоза, декстран, гликоген или их производные.

Подразумевается, что понятие "производные" в контексте настоящего описания включает реактивные производные, например тиолселективные реактивные группы, такие как малеимиды и т.п. Реактивная группа может быть сцеплена с полимером непосредственно или через линкерный сегмент. Очевидно, что остаток такой группы в некоторых случаях может формировать часть продукта в качестве линкерной группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера при необходимости можно варьировать, но, как правило, он должен иметь среднюю молекулярную массу от 500 до 50000 Да, предпочтительно от 5000 до 40000 Да и более предпочтительно от 20000 до 40000 Да. Размер полимера можно, в частности, выбирать на основе предназначения продукта, например способности локализоваться в определенных тканях, таких как опухоли, или удлинять время полужизни в кровотоке (см., обзор Chapman, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 2002, с. 531-545). Так, например, если продукт должен покидать кровоток и проникать в ткань, например при применении для лечения опухоли, то в этом случае может оказаться целесообразным применять низкомолекулярный полимер, например с молекулярной массой примерно 5000 Да. При применении, когда продукт сохраняется в кровотоке, может оказаться целесообразным применять высокомолекулярный полимер, например с молекулярной массой от 20000 до 40000 Да.

Наиболее предпочтительными полимерами являются полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или прежде всего метоксиполи(этиленгликоль) или его производные, предпочтительно с молекулярной массой от примерно 15000 до примерно 40000 Да.

В одном из примеров антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, присоединяют к поли(этиленгликольным) (ПЭГ) звеньям. В одном конкретном примере антитело представляет собой фрагмент антитела, и молекула ПЭГ может быть присоединена через любую доступную боковую группу аминокислоты или концевую функциональную группу аминокислоты, локализованную во фрагменте антитела, например любую свободную аминогруппу, иминогруппу, тиольную, гидроксильную или карбоксильную группу. Указанные аминокислоты могут встречаться в естественных условиях во фрагменте антитела или могут быть сконструированы во фрагменте с помощью методов рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO 98/25971). В одном из примеров молекула антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, при этом модификация представляет собой добавление к С-концу тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот для обеспечения присоединения эффекторной молекулы. Предпочтительно дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина, к которым можно присоединить эффекторную молекулу. Для присоединения двух или большего количества молекул ПЭГ можно применять множественные сайты.

Предпочтительно молекулы ПЭГ ковалентно связывают через тиольную группу по меньшей мере одного остатка цистеина, локализованного во фрагменте антитела. Каждую молекулу полимера, присоединенную к модифицированному фрагменту антитела, можно ковалентно связывать с атомом серы остатка цистеина, локализованного во фрагменте. Ковалентная связь, как правило, представляет собой дисульфидную связь, или в частности связь типа сера-углерод. Когда в качестве точки присоединения соответствующим образом активированной эффекторной молекулы используют тиольную группу, то можно применять, например, тиолселективные производные, такие как малеимиды, и производные цистеина. Активируемый полимер можно применять в качестве исходного материала для получения модифицированных полимером фрагментов антител, описанных выше. Активированный полимер может представлять собой любой полимер, содержащий тиолреактивную группу, такую как α -галокарбоновая кислота или эфир, например, йодацетамид, имид, например, малеимид, винилсульфон или дисульфид. В качестве указанных исходных продуктов можно применять поступающие в продажу материалы (например, от фирмы Nektar, прежнее название Shearwater Polymers Inc., Хантсвилл, шт. Алабама, США) или их можно готовить из поступающих в продажу исходных продуктов с помощью общепринятых химических процессов. Конкретные молекулы ПЭГ включают метокси-ПЭГ-амин с молекулярной массой 20 кДа (который можно получать от фирмы Nektar, прежнее название Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и М-ПЭГ-SPA (который можно получать от фирмы Nektar, прежнее название Shearwater).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, который является ПЭгилированным, т.е. несет ПЭГ (поли(этиленгликоль)), ковалентно присоединенный к нему, например, с помощью метода, описанного в EP 0948544 (см. также "Poly(ethylenglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", под ред. J. Milton Harris, изд-во Plenum Press, New York, 1992, "Poly(ethylenglycol) Chemistry and Biological Applications", под ред. J. Milton Harris и S. Zalipsky, изд-во American Chemical Society, Washington DC, 1997 и "Bioconjugation Protein

Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", под ред. M. Aslam и A. Dent, изд-во Grove Publishers, New York, 1997; Chapman, A. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 2002, с. 531-545). В одном из примеров ПЭГ присоединяют к цистеину в шарнирной области. В одном из примеров модифицированный ПЭГ Fab-фрагмент имеет малеимидную группу, ковалентно связанную с одной тиольной группой в модифицированной шарнирной области. Остаток лизина можно ковалентно связывать с малеимидной группой и к каждой из аминогрупп на остатке лизина можно присоединять метоксиполи(этиленгликольный) полимер с молекулярной массой примерно 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab-фрагменту, может составлять примерно 40000 Да.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является молекула нейтрализующего антитела, обладающая специфичностью в отношении человеческого IL-17A и человеческого IL-17F, которая представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, имеющий тяжелую цепь, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и несущая на С-конце тяжелой цепи модифицированную шарнирную область, которая содержит по меньшей мере один остаток цистеина, к которому присоединена эффекторная молекула. Предпочтительно эффекторная молекула представляет собой ПЭГ и ее присоединяют в помощью методов, описанных в WO 98/25971 и WO 2004/072116, при этом лизил-малеимидная группа присоединена к остатку цистеина на С-конце тяжелой цепи, и каждая аминогруппа остатка лизила ковалентно связана с метоксиполи(этиленгликольным) звеном, молекулярная масса которого составляет примерно 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к антителу, составляет примерно 40000 Да.

В другом примере эффекторные молекулы можно присоединять к фрагментам антител с помощью методов, описанных в международных заявках на патент WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171.

Настоящее изобретение относится также к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую и/или легкую цепь(и) молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении. Предпочтительно последовательность ДНК кодирует тяжелую или легкую цепь молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении. Последовательность ДНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой синтетическую ДНК, например полученную с помощью химического процессинга, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

Последовательности ДНК, которые кодируют молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, можно получать методами, хорошо известными специалистам в данной области. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть или все тяжелые или легкие цепи антитела, можно синтезировать при необходимости из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

ДНК, кодирующие акцепторные каркасные последовательности, являются широко доступными для специалистов в данной области, и их легко можно синтезировать на основе соответствующих известных аминокислотных последовательностей.

Стандартные методы молекулярной биологии можно применять для получения последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении. Требуемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости можно применять сайтнаправленный мутагенез и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Примерами приемлемых последовательностей являются последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

Настоящее изобретение относится также к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК, предлагаемых в настоящем изобретении. Таким образом, изобретение относится к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих антитело, предлагаемое в настоящем изобретении. Предпочтительно клонирующий или экспрессионный вектор содержит две последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, соответственно наряду с соответствующими сигнальными последовательностями. Предпочтительно вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 17.

Общие методы, с помощью которых можно конструировать векторы, методы трансфекции и методы культивирования хорошо известны специалистам в данной области. В этой связи следует упомянуть в качестве ссылки "Current Protocols in Molecular Biology", под ред. F. M. Ausubel, изд-во Wiley Interscience, New York, 1999 и руководство Maniatis Manual, опубликованное изд-вом Cold Spring Harbor Publishing.

Изобретение относится также к клетке-хозяину, содержащей один или несколько клонирующих или экспрессионных векторов, которые содержат одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих антитело, предлагаемое в настоящем изобретении. Любую приемлемую систему клетка-

хозяин/вектор можно применять для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении. Можно применять бактериальные, например, *E. coli*, и другие микробные системы или можно применять также эукариотические системы, например, можно применять экспрессионные системы на основе клеток-хозяев млекопитающих. Приемлемые клетки-хозяева из млекопитающих включают клетки СНО, миеломы или гибридомы.

Настоящее изобретение относится также к способу получения молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, заключающемуся в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, в условиях, пригодных для запуска экспрессии белка с ДНК, которая кодирует молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, и выделяют молекулу антитела.

Молекула антитела может содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, в этом случае только последовательность, кодирующую полипептид тяжелой цепи или легкой цепи, следует использовать для трансфекции клеток-хозяев. Для производства продуктов, содержащих и тяжелые, и легкие цепи, клеточную линию можно трансфектировать двумя векторами, первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тяжелой цепи. Альтернативно этому можно применять один вектор, включающий последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Поскольку антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для лечения и/или профилактики патологического состояния, настоящее изобретение относится также к фармацевтической или диагностической композиции, содержащей молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями. Таким образом, изобретение относится к применению антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, для приготовления лекарственного средства. Композиция, как правило, может поставляться в виде части стерильной фармацевтической композиции, которая обычно может включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Настоящее изобретение относится также к способу получения фармацевтической или диагностической композиции, заключающемуся в том, что добавляют и смешивают молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

Молекула антитела может представлять собой единственное действующее вещество в фармацевтической или диагностической композиции или может быть объединена с другими действующими веществами, включая ингредиенты, представляющие собой другие антитела, например антитело к TNF, антитело к IL-1 β , антитело к Т-клеткам, антитело к IFN γ или антитело к LPS, или ингредиенты, не представляющие собой антитела, такие как ксантины или низкомолекулярный ингибитор.

Фармацевтические композиции предпочтительно содержат антитело, предлагаемое в изобретении, в терапевтически эффективном количестве. Понятие "терапевтически эффективное количество" в контексте настоящего описания относится к количеству терапевтического агента, которое необходимо для лечения, облегчения или предупреждения целевого заболевания или состояния или которое обладает выраженным терапевтическим или профилактическим действием. Для любого антитела терапевтически эффективное количество можно оценивать первоначально либо в анализах на культурах клеток или на созданных на животных моделях, как правило, на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Созданные на животных модели можно применять также для определения соответствующего диапазона концентраций и путей введения. Такую информацию затем можно использовать для определения требуемых доз и путей введения людям.

Точное терапевтически эффективное количество для человека должно зависеть от серьезности болезненного состояния, общего состояния здоровья индивидуума, возраста, веса тела и пола индивидуума, диеты, времени и частоты введения, комбинации(ий) лекарственных средств, реакции чувствительности и толерантности/ответа на терапию. Это количество можно определять с помощью общепринятых экспериментов, и это находится в компетенции лечащего врача. Как правило, терапевтически эффективное количество может составлять от 0,01 до 50 мг/кг, предпочтительно от 0,1 до 20 мг/кг. Удобно, когда фармацевтические композиции представляют собой стандартные дозы, которые содержат предварительно определенное количество действующего вещества, предлагаемого в изобретении, на дозу.

Композиции можно вводить пациенту индивидуально или в сочетании (например, одновременно, последовательно или раздельно) с другими агентами, лекарственными средствами или гормонами.

Доза, в которой вводят молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, зависит от природы состояния, подлежащего лечению, уровня имеющегося воспаления или от того, предполагается ли использовать молекулу антитела в профилактических целях или для лечения существующего состояния.

Частота введения доз должна зависеть от времени полужизни молекулы антитела и продолжительности ее действия. Если молекула антитела имеет короткое время полужизни (например, от 2 до 10 ч), то ее может оказаться необходимым применять в виде одной или нескольких доз в день. В другом варианте, если молекула антитела имеет длинное время полужизни (например, от 2 до 15 дней), то ее может ока-

заться необходимым применять один раз в день, один раз в неделю или даже один раз каждый 1 или 2 месяца.

Фармацевтически приемлемый носитель не должен сам индуцировать производство антител, вредных для индивидуума, которому вводят композицию, и не должен быть токсичным. Приемлемыми носителями могут быть крупные медленно метаболизирующиеся макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты или рН-буферизующие субстанции. Такие носители позволяют приготавливать на основе фармацевтических композиций различные формы в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, густых суспензий и суспензий, предназначенные для приема внутрь пациентом.

Предпочтительными формами применения являются формы, пригодные для парентерального введения, например путем инъекции или инфузии, например путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Когда продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном наполнителе и может содержать вещества, предназначенные для приготовления препаративных форм, такие как суспендирующие вещества, консерванты, стабилизаторы и/или диспергирующие вещества. Альтернативно этому молекула антитела может присутствовать в сухой форме, предназначенной для восстановления перед применением соответствующей стерильной жидкостью.

После включения в препаративную форму композиции, предлагаемые в изобретении, можно вводить непосредственно индивидууму. Подлежащие лечению индивидуумы могут представлять собой животных. Однако предпочтительно композиции адаптируют для введения человеку.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить любыми из многочисленных путей, включая (но, не ограничиваясь только ими) оральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, подоболочечный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный (см., например, WO 98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, подъязычный, внутривагинальный или ректальный пути. Для введения фармацевтических композиций, предлагаемых в изобретении, можно применять также гипоспреи. Как правило, терапевтические композиции можно приготавливать в виде предназначенных для инъекций форм, либо жидких растворов, либо суспензий. Можно получать также твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких наполнителях перед инъекцией.

Непосредственное введение композиций следует, как правило, осуществлять путем инъекции подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно или внутримышечно, или вводить в интерстициальное пространство ткани. Композиции можно вводить также в область повреждения. Применяемая схема прима лекарственного средства может быть основана на использовании однократной дозы или нескольких доз.

Должно быть очевидно, что действующее вещество в композиции должно представлять собой молекулу антитела. Само по себе оно может быть чувствительно к расщеплению в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию вводят путем, предусматривающим попадание в желудочно-кишечный тракт, то композиция должна содержать агенты, которые защищают антитело от расщепления, но которые позволяют антителу высвободиться после его абсорбции в желудочно-кишечном тракте.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей представлено в Remington's Pharmaceutical Sciences, изд-во Mack Publishing Company, N.J., 1991.

Одним из вариантов осуществления изобретения является препаративная форма, представляющая собой препаративную форму для местного применения, включая ингаляцию.

Приемлемые предназначенные для ингаляции препараты включают порошки для ингаляций, аэрозоли с дозирующим устройством, содержащие газы-пропелленты, или растворы для ингаляций без газообразных пропеллентов. Предлагаемые в настоящем изобретении порошки для ингаляций, содержащие действующее вещество, могут состоять только из вышеуказанных действующих веществ или смеси вышеуказанных действующих веществ с физиологически приемлемым эксципиентом.

Указанные порошки для ингаляций могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), многоатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Предпочтительно применяют моно- или дисахариды, в частности, лактозу или глюкозу можно применять (но, не ограничиваясь только указанным) в форме их гидратов.

Для отложения частиц в легких требуется, чтобы размер частиц составлял менее 10 мкм, в том числе 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности от 1 до 5 мкм. Наиболее важным является размер частиц действующего вещества (такого как антитело или его фрагмент).

Газы-пропелленты, которые можно применять для приготовления предназначенных для ингаляции аэрозолей, хорошо известны в данной области. Приемлемые газы-пропелленты выбирают углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеуказанные газы-пропелленты можно применять индивидуально или в виде их смесей.

Наиболее предпочтительными газами-пропеллентами являются галогенированные алкановые производные, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG 227. Из вышеуказанных галогенированных углеводородов наиболее предпочтительными являются TG 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG 227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), а также их смеси.

Предназначенные для ингаляции аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, могут содержать также другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (детергенты), антиоксиданты, замасливатели и агенты для регулирования значения pH. Все указанные ингредиенты известны в данной области.

Предлагаемые в изобретении аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, которые предназначены для ингаляции, могут содержать действующее вещество в концентрации вплоть до 5 мас.%. Аэрозоли, предлагаемые в изобретении, содержат например, действующее вещество в концентрации от 0,002 до 5 мас.%, от 0,01 до 3 мас.%, от 0,015 до 2% мас.%, от 0,1 до 2 мас.%, от 0,5 до 2 мас.% или от 0,5 до 1 мас.%.

Альтернативно этому для местного внесения в легкое можно применять также препаративную форму в виде жидкого раствора или суспензии, например с использованием такого устройства как распылитель, например распылитель, соединенный с компрессором (например, распылитель Pari LC-Jet Plus(R), соединенный с компрессором Pari Master(R), изготовленный на фирме Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, шт. Виргиния).

Антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить в виде дисперсии в растворителе, например в форме раствора или суспензии. Его можно суспендировать в соответствующем физиологическом растворе, например соляном растворе или другом фармацевтически приемлемом растворителе или забуференном растворе. Буференные растворы, известные в данной области, могут содержать динатрия эдетат в количестве от 0,05 до 0,15 мг, NaCl в количестве от 8,0 до 9,0 мг, полисорбат в количестве от 0,15 до 0,25 мг, безводную лимонную кислоту в количестве от 0,25 до 0,30 мг и цитрат натрия в количестве от 0,45 до 0,55 мг на 1 мл воды, при этом значение pH составляет примерно от 4,0 до 5,0. Можно применять, например, суспензию лиофилизированного антитела.

Препаративные формы терапевтических суспензий или растворов могут содержать также один или несколько эксципиентов. Эксципиенты хорошо известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТК, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии можно капсулировать в липосомы или биоразложимые микросферы. Препаративную форму следует, как правило, получать в практически стерильной форме с использованием стерильных процессов изготовления.

Они могут включать получение и стерилизацию фильтрацией забуференного растворителя/раствора, применяемого в препаративной форме, асептическое суспендирование антитела в стерильном забуференном растворителе/растворе и диспергирование препаративной формы в стерильных емкостях с использованием методов, известных обычным специалистам в данной области.

Распыляемую препаративную форму, представленную в настоящем описании, можно приготавливать, например в виде стандартных доз (например, в виде запечатанных пластиковых контейнеров или флаконов), упакованных в оболочку из фольги. Каждый флакон содержит стандартную дозу в объеме, например, 2 мл, в растворителе/забуференном растворе.

Антитела, указанные в настоящем описании, можно вводить с помощью распыления.

Также подразумевается, что антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять в целях генной терапии. Для этого последовательности ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи молекулы антитела под контролем соответствующих компонентов ДНК, интродуцируют пациенту таким образом, чтобы происходила экспрессия цепей антитела с последовательности ДНК и их сборка *in situ*.

Настоящее изобретение относится также к молекуле, предназначенной для применения с целью контроля воспалительных заболеваний. Предпочтительно молекулу антитела можно применять для снижения воспалительного процесса или для предупреждения воспалительного процесса.

Настоящее изобретение относится также к молекуле антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, для применения с целью лечения или профилактики патологического нарушения, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или ассоциированного с повышенными уровнями IL-17A и/или IL-17F. Предпочтительно патологическое состояние выбирают из группы, включающей инфекции (вирусные, бактериальные, грибные и паразитарные), эндотоксический шок, ассоциированный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, псориазический артрит, системный ювенильный идиопатический артрит (JIA), системную красную волчанку (SLE), астму, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей (COAD), хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), острое повреждение легких, воспаление тазовых органов, болезнь Альцгеймера, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, синдром

раздраженной толстой кишки, неспецифический язвенный колит, болезнь Кастлемана, анкилозирующий спондилит и другие спондилоартропатии, дерматомиозит, миокардит, увеит, экзофтальм, аутоиммунный тиреоидит, болезнь Пейрони, болезнь чрева, болезнь мочевого пузыря, пиелонидальную болезнь, перитонит, псориаз, атопический дерматит, васкулит, спайки, связанные с хирургическим вмешательством, "удар", аутоиммунный диабет, диабет типа I, артрит Лайма, менингоэнцефалит, опосредуемые иммунной системой воспалительные нарушения центральной и периферической нервной системы, такие как рассеянный склероз и синдром Гийена-Барре, другие аутоиммунные нарушения, панкреатит, травму (хирургическое вмешательство), реакцию трансплантат против хозяина, отторжение трансплантата, фиброзные нарушения, включая фиброз легкого, фиброз печени, фиброз почки, склеродерму или системный склероз, рак (как плотные (солидные) опухоли, такие как меланомы, гепатобластомы, саркомы, плоскоклеточные карциномы, переходно-клеточные виды рака, различные виды рака яичника, так и гематологические злокачественные заболевания и прежде всего острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз, рак желудка и рак ободочной кишки), болезни сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистую коагуляцию, резорбцию кости, остеопороз, периодонтит и гипохлоридрию.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, применяют для лечения или профилактики патологического нарушения, выбранного из группы, включающей артрит, ревматоидный артрит, псориаз, псориазический артрит, системный ювенильный идиопатический артрит (JIA), системную красную волчанку (SLE), астму, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей, хроническое обструктивное заболевание легких, атопический дерматит, склеродерму, системный склероз, фиброз легкого, воспалительные заболевания кишечника, анкилозирующий спондилит и другие спондилоартропатии и рак.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, применяют для лечения или профилактики патологического нарушения, выбранного из группы, включающей артрит, ревматоидный артрит, псориаз, псориазический артрит, системный ювенильный идиопатический артрит (JIA), системную красную волчанку (SLE), астму, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей, хроническое обструктивное заболевание легких, атопический дерматит, склеродерму, системный склероз, фиброз легкого, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, анкилозирующий спондилит и другие спондилоартропатии и рак.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, применяют для лечения или профилактики патологического нарушения, выбранного из группы, включающей артрит, ревматоидный артрит, псориаз, псориазический артрит, системный ювенильный идиопатический артрит (JIA), системную красную волчанку (SLE), астму, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей, хроническое обструктивное заболевание легких, атопический дерматит, склеродерму, системный склероз, фиброз легкого, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, анкилозирующий спондилит и другие спондилоартропатии.

В одном из вариантов осуществления изобретения патологическое нарушение представляет собой ревматоидный артрит.

В одном из вариантов осуществления изобретения патологическое нарушение представляет собой болезнь Крона.

В одном из вариантов осуществления изобретения патологическое нарушение представляет собой неспецифический язвенный колит.

В одном из примеров антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, применяют для лечения воспалительного или связанного с иммунной системой заболевания. В одном из примеров воспалительное или связанное с иммунной системой заболевание выбирают из группы, включающей ревматоидный артрит, болезнь Крона и неспецифический язвенный колит.

Настоящее изобретение относится также к применению молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, для лечения или профилактики боли, прежде всего боли, ассоциированной с воспалением.

Настоящее изобретение относится также к применению молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или профилактики патологического нарушения, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F, или ассоциированного с повышенным уровнем IL-17A и/или IL-17F. Предпочтительно патологическое нарушение представляет собой одно из медицинских показаний, указанных выше в настоящем описании. Настоящее изобретение относится также к применению молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или профилактики боли, прежде всего боли, ассоциированной с воспалением.

Молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, можно применять в любой терапии, при которой требуется снижать воздействие IL-17A и/или IL-17F на организм человека или животного. IL-17A и/или IL-17F могут находиться в кровотоке или могут присутствовать в нежелательных высоких концентрациях в конкретной области организма, например в месте воспаления.

Молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, предпочтительно применяют для кон-

троля воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания или рака.

Настоящее изобретение относится также к способу лечения человека или животного, страдающего или имеющего риск возникновения нарушения, опосредуемого или IL-17A, и/или IL-17F, заключающемуся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении.

Молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, можно применять также для диагностики, например, диагностики *in vivo* и выявления статуса заболевания, в котором принимают участие IL-17A и/или IL-17F.

Ниже настоящее изобретение дополнительно описано с помощью примеров, которые даны только с целью иллюстрации, и со ссылкой на приведенные чертежи, на которых показано следующее.

На фиг. 1:

- а) V-область легкой цепи антитела CA028_0496g3 (SEQ ID NO: 7),
- б) V-область тяжелой цепи антитела CA028_0496g3 (SEQ ID NO: 9),
- в) CDRH1 (SEQ ID NO: 1), CDRH2 (SEQ ID NO: 2), CDRH3 (SEQ ID NO: 3), CDRL1 (SEQ ID NO: 4), CDRL2 (SEQ ID NO: 5), CDRL3 (SEQ ID NO: 6) антитела CA028_496g3,
- г) легкая цепь антитела CA028_496g3 (SEQ ID NO: 11),
- д) легкая цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 2:

- а) тяжелая цепь антитела CA028_496g3 (SEQ ID NO: 15),
- б) тяжелая цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 16),
- в) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела CA028_496g3 (без сигнальной последовательности) (SEQ ID NO: 13).

На фиг. 3:

- а) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 14),
- б) ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи антитела CA028_496g3 (SEQ ID NO: 8),
- в) ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 10).

На фиг. 4: ДНК (включая экзоны), кодирующая тяжелую цепь антитела CA028_496g3, без сигнальной последовательности (SEQ ID NO: 17).

На фиг. 5: ДНК (включая экзоны и сигнальную последовательность), кодирующая тяжелую цепь антитела CA028_496g3 (SEQ ID NO: 18).

На фиг. 6: кДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 19).

На фиг. 7: воздействие антител CA0280496 (обозначено как 496g1 в сноске) и CA028_00496.g3 (обозначено как 496.g3 в сноске) на индуцированное человеческим IL-17F производство IL-6 в клетках линии HeLa.

Пример 1. Получение улучшенного нейтрализующего антитела, которое связывается с IL-17A и IL-17F.

Выделение и гуманизация антитела CA0280496 описаны ранее в WO 2008/047134. CA0280496 представляет собой гуманизованное нейтрализующее антитело, которое связывается и с IL-17A, и с IL-17F, и содержит трансплантированные переменные области gL7 и gH9, последовательности которых представлены в WO 2008/047134. Акцепторный каркасный участок тяжелой цепи имеет последовательность человеческой зародышевой линии VH3 1-3 3-07, причем каркасный участок 4 выведен из этой части человеческой JH-области зародышевой линии JH4. Акцепторный каркасный участок легкой цепи имеет последовательность человеческой зародышевой линии VK1 2-1-(1) L4, причем каркасный участок 4 выведен из этой части человеческой JK-области зародышевой линии JK1.

Антитело CA02800496 подвергли процедуре созревания аффинности для повышения аффинности антитела к IL-17F, сохраняя при этом аффинность к IL-17A. В отличие от антитела CA02800496, антитело с созревшей аффинностью, известное как CA028_00496.g3, экспрессировалось в виде IgG1, а не IgG4. Модифицировали гены для создания версий с созревшей аффинностью с помощью сайтнаправленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидов. Последовательность гена переменной области легкой цепи с созревшей аффинностью (gL57) субклонировали в экспрессионном векторе для человеческой легкой цепи рКН10.1 (фирма UCB Celltech), который содержит ДНК, кодирующую константную область человеческой С-каппа-цепи (аллотип Km3). Неизмененную последовательность переменной области тяжелой цепи (gH9) субклонировали с экспрессионном векторе pVhg1 FL (фирма UCB Celltech), который содержит ДНК, кодирующую константные области человеческой тяжелой гамма-1-цепи. Плазмидами котрансфектировали клетки CHO, используя процедуру Lipofectamine™ 2000 согласно инструкциям производителя (фирма InVitrogen, каталожный № 11668).

Окончательные последовательности переменных областей с созревшей аффинностью антитела CA028_00496.g3 представлены на фиг. 1а и 1б. В антителе CA028_00496.g3 последовательность переменной области тяжелой цепи такая же, как у родительского антитела CA02800496. В отличие от этого, переменная область легкой цепи различается 5 аминокислотами. Пять остатков, которые являются раз-

ными в легкой цепи антитела CA02800496 и антитела CA028_00496.g3, подчеркнуты на фиг. 1а.

Пример 2. BIACORE-анализ.

Как описано ниже, формат анализа включал захват антитела CA028_00496.g3 с помощью иммобилизованного антитела к человеческому IgG, Fc-специфического, с последующей титрацией человеческого IL-17A и человеческого IL-17F над поверхностью захвата.

Биомолекулярный анализ захвата осуществляли с помощью устройства Biacore 3000 (фирма Biacore AB). Анализ осуществляли при 25°C. F(ab')₂-фрагмент AffiniPure козьего античеловеческого IgG, Fc-специфического (фирма Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (фирма Biacore AB) посредством аминного сочетания с уровнем, составляющим примерно 6000 единиц ответа (RU). HBS-EP-буфер (10мМ HEPES pH 7,4, 0,15М NaCl, 3мМ ЭДТК, 0,005% Сурфактанта P20, фирма Biacore AB) применяли в качестве подвижного буфера со скоростью потока 10 мкл/мин. Инъектировали 10 мкл CA028_00496.g3 (0,5 мкг/мл), который применяли для захвата с помощью иммобилизованного античеловеческого IgG-Fc. Человеческий IL-17A (полученный в лабораторных условиях на фирме UCSB) титровали над захваченным CA028_00496.g3, используя в качестве начальной концентрацию 5нМ, со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 3 мин, а затем в течение 20 мин давали пройти диссоциации. Человеческий IL-17F (фирма R&D systems) титровали над захваченным CA028_00496.g3, используя в качестве начальной концентрации 10нМ, со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 3 мин, а затем в течение 5 мин давали пройти диссоциации. Поверхность регенерировали со скоростью потока 10 мкл/мин путем инъекции 10 мкл 40мМ HCl с последующей инъекцией 5 мкл 5мМ NaOH.

Аффинность CA028_496.g3 к человеческим IL-17F и IL-17A

	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (M)	KD (пМ)
hIL-17F	2,49E+06	8,74E-05	3,51E-11	35
	3,49E+06	5,08E-05	1,46E-11	15
	2,99E+06	6,91E-05	2,31E-11	23
hIL-17A	4,66E+06	2,04E-05	4,38E-12	4,4
	4,52E+06	8,66E-06	1,92E-12	1,9
	4,59E+06	1,45E-05	3,17E-12	3,2

Кривые связывания, из которых вычитали фоновый уровень, полученный с использованием двух контролей, анализировали с помощью программы BIAevaluation (версия 4.1) согласно стандартным процедурам. Кинетические параметры определяли на основе алгоритма аппроксимации. В данных, представленных в табл.1, средние значения выделены серым цветом.

Величина аффинности, определенная для исходного антитела CA0280496, характеризующая связывание с IL-17A, составляла 16 пМ, а характеризующая связывание IL-17F, составляла 1750 пМ. В отличие от этого, аффинность улучшенного антитела CA0280496 g3 к IL-17A составляла 3,2 пМ, а к IL-17F составляла 23 пМ. Аффинность антитела CA0280496 к IL-17F повышалась более чем в 70 раз без снижения аффинности антитела к IL-17A. Аффинность к IL-17A фактически повышалась в 5 раз.

Повышалась также аффинность CA028_0496 g3 в гетеродимеру IL-17A/F (который создавали согласно методу, описанному в WO 2008/047134), установлено, что величина аффинности составляла 26 пМ (данные не представлены).

Пример 3.

Эффективность CA028_00496.g1 (ранее описанного в WO 2008/047134) и CA028_00496.g3 в отношении нейтрализации человеческого IL-17F определяли с использованием биологического анализа на клетках линии HeLa. Клетки линии HeLa получали из банка клеток ATCC (ATCC CCL-2). Клетки выращивали в модифицированной по методу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, пенициллином, гентамицином и глутамином. Высеивали по 1×10^4 клеток в 96-луночные плоскодонные планшеты для культуры ткани. Клетки инкубировали в течение ночи и однократно отмывали буфером для анализа. Клетки линии HeLa стимулировали комбинацией рекомбинантного человеческого IL-17F (125 нг/мл) и фактором некроза опухолей-альфа (TNF-α) (1 нг/мл) в течение 48 ч в присутствии антител в различных концентрациях. В клетках линии HeLa IL-17F обладает синергетическим действием с TNF-альфа в отношении индукции производства IL-6, которое можно определять количественно с помощью специфического набора для MSD-анализа. Полученные количества секретиремого IL-6 оценивали с использованием технологии мезомасштабного анализа (Meso Scale Discovery (MSD)) и рассчитывали значения IC₅₀. Для CA028_00496.g1 и CA028_00496.g3 обнаружено зависящее от дозы ингибирование биологической активности IL-17F, определенное с помощью биологического анализа на клетках линии HeLa (фиг. 7). Активность CA028_00496.g1 и CA028_00496.g3, определенную при осуществлении анализа на клетках линии HeLa, выражали в виде дозы, необходимой для ингибирования на 50% активности IL-17F (IC₅₀). Значение IC₅₀ для CA028_00496.g1 составляло 92 мкг/мл, а для CA028_00496.g3 - 4 нг/мл.

Способность CA028_00496.g3 нейтрализовать IL-17A, продемонстрированную ранее для CA028_00496.g1 в WO 2008/047134, подтверждали с использованием такого же анализа, в котором IL-17F заменяли на IL-17A (данные не представлены).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нейтрализующее антитело или его функционально активный фрагмент, которое связывается с человеческим IL-17A и человеческим IL-17F, имеющее легкую и тяжелую цепи, где переменная область легкой цепи содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

2. Антитело или его функционально активный фрагмент по п.1, которое связывается также с гетеродимером IL-17A/IL-17F.

3. Антитело по п.1 или 2, где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

4. Функционально активный фрагмент антитела по п.1 или 2, где фрагмент антитела выбран группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, scFv- и Fv-фрагмента.

5. Нейтрализующее антитело, которое связывается с человеческим IL-17A и человеческим IL-17F, имеющее тяжелую цепь, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

6. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая легкую цепь антитела или его функционально активного фрагмента по одному из пп.1-5.

7. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепь антитела или его функционально активного фрагмента по одному из пп.1-5.

8. Экспрессионный вектор, содержащий последовательность ДНК по п.7.

9. Вектор по п.8, где вектор содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 17.

10. Клетка-хозяин для получения антитела по пп.1-5 или его функционально активного фрагмента, содержащая один или несколько экспрессионных векторов по п.8 или 9

11. Способ получения антитела или его функционально активного фрагмента по одному из пп.1-5, включающий культивирование клетки-хозяина по п.10 и выделение антитела.

12. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики нарушений, опосредованных IL-17A и/или IL-17F или ассоциированных с повышенным уровнем IL-17A и/или IL-17F, содержащая антитело или его функционально активный фрагмент по одному из пп.1-5 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, содержащая дополнительно другие действующие вещества, включая ингредиенты, представляющие собой другие антитела, выбранные из группы, включающей антитело к TNF, антитело к IL-1 β , антитело к Т-клеткам, антитело к IFN γ и антитело к LPS, или ингредиенты, не представляющие собой антитела, такие как ксантины или низкомолекулярные ингибиторы.

14. Применение антитела или его функционально активного фрагмента по одному из пп.1-5 для лечения или профилактики нарушений, опосредованных IL-17A и/или IL-17F или ассоциированных с повышенным уровнем IL-17A и/или IL-17F.

15. Применение антитела или его функционально активного фрагмента по одному из пп.1-5 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или профилактики нарушения, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F или ассоциированного с повышенным уровнем IL-17A и/или IL-17F.

16. Применение фармацевтической композиции по п.12 или 13 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или профилактики нарушения, опосредуемого IL-17A и/или IL-17F или ассоциированного с повышенным уровнем IL-17A и/или IL-17F.

(а) Варибельная область легкой цепи антитела CA028_496 g3 (SEQ ID NO: 7)

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRADESVRTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
SGSGSGTDFRLTISLQPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIK

(б) Варибельная область тяжелой цепи антитела CA028_496 g3 (SEQ ID NO: 9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLVTVS
S

(в)

CDRH1: GFTFSDYNMA (SEQ ID NO: 1)
CDRH2: TITYEGRNTYYRDSVKG (SEQ ID NO: 2)
CDRH3: PPQYYEGSIYRLWFAH (SEQ ID NO: 3)
CDRL1: RADESVRTLMH (SEQ ID NO: 4)
CDRL2: LVSNSEI (SEQ ID NO: 5)
CDRL3: QQTWSDPWT (SEQ ID NO: 6)

(г) Легкая цепь антитела CA028_496g3 (SEQ ID NO: 11)

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRADESVRTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
SGSGSGTDFRLTISLQPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(д) Легкая цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 12)

MSVPTQVLGLLLLWLT DARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRADESVRTLMHWYQQKPGK
APKLLIYLVSNSEIGVPDRFSGSGSGTDFRLTISLQPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 1

(а) Тяжелая цепь антитела CA028_496g3 (SEQ ID NO: 15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(б) Тяжелая цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательности (SEQ ID NO: 16)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGK
GLEWVATITYEGRNTYYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCASPPQYYEG
SIYRLWFAHWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(в) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела CA028_496g3 (без сигнальной последовательности) (SEQ ID NO: 13)

gccatccagctgacccagagcccttcctctctcagcgccagtgtcggagacagagtgactat
tacctgcagggctgacgaaagcgtgagaacattgatgcactggtaccaacagaagcctggca
aagccccaagctcctgatctatctggtttccaattcggagattggagtccccgacaggttc
agcggcagtgggctctggaactgactttcgctgacaatctcctcactccagcccgaagattt
cgccacctactattgccagcagacttgagcgcacccttgacatttgacagggcacaaaag
tgagatcaagcgtacggtagcggccccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcag
ttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaa
agtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagc
aggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactac
gagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaa
gagcttcaacaggggagagtgttag

Фиг. 2

(а) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 14)

atgtcagttccacacaggtgctgggcctgcttctgttggtggctcaccgatgctaggtgtgc
 catccagctgaccagagcccttctctctcagcgccagtgctcgagacagagtgactatta
 cctgcagggctgacgaaagcgtgagaacattgatgcactggtagccaacagaagcctggcaaa
 gcccccaagctcctgatctatctggtttccaattcggagattggagtccccgacaggttcag
 cggcagtgggctctggaactgactttcgctgacaatctcctcactccagcccgaagatttcg
 ccacctaactattgccagcagacttggagcgacccttggacatttggacagggcacaaaagtg
 gagatcaagcgtacggtagcggccccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
 gaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaaag
 tacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcag
 gacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
 gaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaga
 gcttcaacaggggagagtgttag

(б) ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи антитела CA028_496 g3 (SEQ ID NO: 8)

gccatccagctgaccagagcccttctctctcagcgccagtgctcgagacagagtgactat
 tacctgcagggctgacgaaagcgtgagaacattgatgcactggtagccaacagaagcctggca
 aagcccccaagctcctgatctatctggtttccaattcggagattggagtccccgacaggttc
 agcggcagtgggctctggaactgactttcgctgacaatctcctcactccagcccgaagattt
 cgccacctaactattgccagcagacttggagcgacccttggacatttggacagggcacaaaag
 tggagatcaag

(в) ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи антитела CA028_496 g3 (SEQ ID NO: 10)

gaggttcagctcgttgaatccggaggcggactcgtgcagcctgggggctccttgcggtgag
 ctgctgctgccagtggttcaactttcagcgattacaatatggcctgggtgcccaggccccag
 gcaagggctctggagtggtggccacaattacctatgagggcagaaacacttattaccgggat
 tcagtgaagggcgatttaccatcagcagggataatgcaaagaacagtctgtacctgcagat
 gaactctctgagagctgaggacaccgctgtctactattgtgcaagcccaccccagtagtatg
 agggctcaatctacagattgtggtttgccattggggccagggaaactggtagccgtctcagc
 agc

Фиг. 3

ДНК (включая экзоны), кодирующая тяжелую цепь антитела CA028_496g3 без сигнальной последовательности (SEQ ID NO: 17)

gaggttcagctcgttgaatccggaggcggactcgtgcagcctgggggctccttgcggtgag
ctgcgctgccagtggcttcactttcagcgattacaatatggcctgggtgcgccaggccccag
gcaagggctctggagtgggtggccacaattacctatgagggcagaaacacttattaccgggat
tcagtgaaagggcgatttaccatcagcagggataatgcaaagaacagtctgtacctgcagat
gaactctctgagagctgaggacaccgctgtctactattgtgcaagcccaccccagtactatg
agggctcaatctacagattgtggtttgccattggggccagggaaactggtgaccgtctcg
agcgttctacaaagggcccatcggcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgg
gggcacagcggccctgggctgcctgggcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgt
ggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggctgtcctacagtcctcagga
ctctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacat
ctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtcgacaagaaagttgagccaaatctt
gtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtc
ttccttccccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatg
cgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtg
gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagcgcagcccc
gagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
gcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc
tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc
gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
a

Фиг. 4

ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность и экзоны (SEQ ID NO: 18)

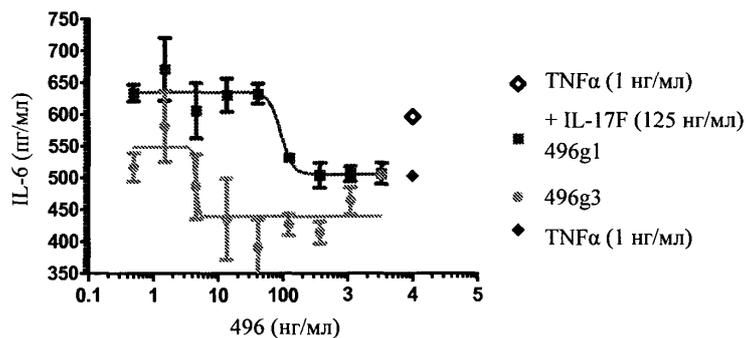
```
atggaatgggcctgggtcttcctgtttttcctttctgtcacaaccggggtgcacagcgaggt
tcagctcgttgaatccggaggcggactcgtgcagcctgggggctccttgcggtgagctgcg
ctgccagtggcttcactttcagcgattacaatatggcctgggtgcgccaggccccaggcaag
ggctctggagtgggtggccacaattacctatgagggcagaaacacttattaccgggattcagt
gaaagggcgatttaccatcagcagggataatgcaaagaacagctctgtacctgcagatgaact
ctctgagagctgaggacaccgctgtctactattgtgcaagcccaccccagtactatgagggc
tcaatctacagattgtggtttgccattggggccagggaacactggtgaccgtctcgagcgc
ttctacaaagggcccatcggctctccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggca
cagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggaac
tcagcgcacctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactcta
ctccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgca
acgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtcgacaagaaagttgagccaaatcttgtgac
aaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttcct
cttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtg
tggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggag
gtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcag
cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcca
acaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagcgcagccccgagaa
ccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgac
ctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagc
cggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctac
agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
```

Фиг. 5

кДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела CA028_496g3, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 19)

atggaatggtcctgggtcttcctgttttctcttctgtcacaaccggggtgcacagcaggt
 tcagctcgttgaatccggaggcggactcgtgcagcctgggggtccttgccggtgagctgcg
 ctgccagtggcttcactttcagcgattacaatatggcctgggtgcccagggccccaggcaag
 ggtctggagtgggtggccacaattacctatgagggcagaacacttattaccgggattcagt
 gaaagggcgatttaccatcagcagggataatgcaaagaacagtctgtacctgcagatgaact
 ctctgagagctgaggacaccgctgtctactattgtgcaagcccaccctcagtaactatgagggc
 tcaatctacagattgtggtttgccattggggccagggaaactggtgaccgtctcagagcgc
 ttctacaaggggccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggca
 cagcggccctgggctgcctggtcaaggactactccccgaaccggtgacgggtgctggtggaac
 tcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactcta
 ctccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatctgca
 acgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtcgacaagaaagttgagcccaaatcttgtgac
 aaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttct
 ctccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtg
 tggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggag
 gtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcca
 acaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagcgcagccccgagaa
 ccacaggtgtacaccctgccccatccccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgac
 ctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagc
 cggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctac
 agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
 gcatgaggctctgcacaaccactacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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