

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037090**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.02.04**

(21) Номер заявки  
**201600277**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.03.23**

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

---

(54) **ВЫСОКОАФФИННЫЕ И АГРЕГАЦИОННО СТАБИЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ  
ВАРИАБЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ V<sub>L</sub> И ПРОИЗВОДНОГО V<sub>HH</sub>**

---

(31) **2014138740**

(32) **2014.09.26**

(33) **RU**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/RU2015/000163**

(87) **WO 2016/048188 2016.03.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ  
ОБЩЕСТВО "БИОКАД" (RU)**

(56) **RU-C2-2426741**

S. MUYLDERMANS et al. "Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2001, Vol. 26, no. 4, p. 230-235  
**US-A1-20120225065**

K. CONRATH et al. Antigen Binding and Solubility Effects upon the Veneering of a Camel VHH in Framework-2 to Mimic a VH, *J. Mol. Biol.*, 2005, Vol. 350, p. 112-125

(72) Изобретатель:

**Улитин Андрей Борисович, Соловьев  
Валерий Владимирович, Неманкин  
Тимофей Александрович, Гончарова  
Ольга Владимировна, Екимова  
Виктория Михайловна, Евдокимов  
Станислав Рудольфович, Черных  
Юлия Сергеевна, Коржавин Дмитрий  
Валерьевич, Софронова Екатерина  
Владимировна, Черновская Татьяна  
Вениаминовна, Устюгов Яков  
Юрьевич, Иванов Роман Алексеевич,  
Морозов Дмитрий Валентинович (RU)**

(74) Представитель:

**Худяев М.Е. (RU)**

---

(57) Предложены моноклональные антитела типа IgG, содержащие переменные домены в виде комбинации производного V<sub>HH</sub> с переменным доменом легкой цепи V<sub>L</sub>. Указанные антитела могут содержать замены аминокислот в позициях 44 и/или 45 (по нумерации по Kabat) или их комбинации. Описанные антитела обладают повышенной аффинностью и улучшенной агрегационной стабильностью.

---

**B1**

**037090**

**037090**

**B1**

### Введение

Антитела, или иммуноглобулины (Ig), - это растворимые гликопротеины крови и тканевой жидкости, играющие центральную роль в системе гуморального иммунитета у позвоночных. Антитела синтезируются В-лимфоцитами в ответ на чужеродные биологические и химические вещества (антигены) самой разнообразной структуры с целью их нейтрализации. Благодаря высокой специфичности и высокой аффинности связывания с определенным антигеном, а также возможности возникновения антител к практически неограниченному репертуару антигенов антитела и их производные являются одними из наиболее важных реагентов для использования в фундаментальных, прикладных и медицинских исследованиях.

Классические антитела [1, 2] представляют собой крупные мультимерные белки (IgG ~150 кДа), объединяющие две идентичные тяжелые Н-цепи, которые, в свою очередь, состоят из переменного  $V_H$ , трех константных CH1, CH2, CH3 доменов и шарнирного участка между CH1 и CH2 доменами, и две идентичные легкие L цепи, состоящие из переменного  $V_L$ , и константного,  $C_L$  доменов. Четырехцепочечная молекула объединена посредством нековалентных и ковалентных (дисульфидных) связей между цепями. При помощи протеазы папаина антитела можно расщепить на два фрагмента: Fab (Fragment antigen binding, антиген связывающий фрагмент) и Fc (Fragment crystallizable, фрагмент, способный к кристаллизации). Соответственно, одна область молекулы антител (Fab) определяет ее антигенную специфичность, а другая (Fc) осуществляет эффекторные функции, которые направлены на элиминацию антигена [3, 4]. Домены CH1 и CH2 Н-цепи разделены шарнирной областью ("hinge region"), от которой зависит подвижность Fab-фрагмента и взаимодействие молекулы IgG с эффекторными рецепторами иммуноглобулинов, расположенными на клетках. CH2 домен содержит участки связывания как Fc $\gamma$  рецепторов, опосредующих клеточную активацию (ADCC и ADCP), так и молекул системы комплемента (CDC). Кроме того, в этом домене присутствует сайт, являющийся местом присоединения углеводов для всех изоформ иммуноглобулинов. CH3-домен в значительной степени определяет стабильность димера IgG, а также взаимодействует с FcRn рецептором на поверхности клеток, определяя фармакокинетические свойства антител и их распределение и метаболизм внутри организма. Комбинация антигенсвязывающих участков (CDR - Complementarity Determining Regions) переменного домена тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменного домена легкой цепи ( $V_L$ ) формирует участок связывания антигена, в то время как каркасные регионы переменных доменов (FR - Framework Regions) и константные домены антител непосредственно не участвуют в распознавании антигена. Минимизированной производной антигенсвязывающего фрагмента классических антител является одноцепочечная конструкция, в которой переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены линкерной последовательностью (scFv).

Важным открытием явилось обнаружение в крови представителей семейства Camelidae (верблюды, ламы, викунии) в значительном количестве особых неканонических антител с упрощенной структурой [5]. Такие антитела ("heavy chain antibody", HCAb) состоят из димера только одной укороченной тяжелой цепи (без CH1-домена), а легкая цепь при этом отсутствует. Антиген-узнающий участок HCAb формируется лишь одним переменным доменом тяжелой цепи ( $V_{HH}$ ), который непосредственно связан через шарнирную область с Fc-доменом. Часто вместо  $V_{HH}$  используют термин "однодоменное антитело", "nanobody" (нанотело), "мини-антитело" или "наноантитело". Как оказалось, такая монодоменная структура в изолированном виде, кроме малых размеров (12-15 кДа), обладает рядом преимуществ перед классическими IgG антителами, а именно агрегационной, химической и термостабильностью. Антитела  $V_{HH}$  можно эффективно клонировать и экспрессировать в бактериях и дрожжах. Обладая такими свойствами, они получили технологическое развитие как в терапевтическом направлении, развиваемом компанией "Ablynx", так и области лабораторной и промышленной хроматографии с линейкой носителей Capture Select.

Неканонические антитела (HCAb), состоящие из димера только тяжелой цепи иммуноглобулина, впервые обнаружены при электрофоретическом анализе иммуноглобулинов в сыворотке крови различных представителей семейства верблюдовых [5]. Относительная доля HCAb варьирует от примерно 15-25% (всех IgG) у лам и викуний до примерно 60-80% у верблюдов [6].

Как предполагают, неканонические антитела (HCAb), по крайней мере, в случае верблюдовых, представляют собой результат относительно недавней эволюции генов канонических антител. Два константных домена тяжелых цепей, CH2 и CH3, в случае HCAb и классических антител высококонсервативны. В составе антител HCAb домен, соответствующий первому константному CH1-домену классических антител, отсутствует. Геном одногорбого верблюда (вид Dromedary) содержит кластер примерно из 50  $V_H$ - и 40  $V_{HH}$ -генеративных генов, за которыми располагаются множественные гены D-сегментов, J-сегментов и гены константных участков ( $C_{\mu}$ ,  $C_{\gamma}$ ,  $C_{\epsilon}$ ,  $C_{\alpha}$ ). Очевидно, что некоторые из  $C_{\gamma}$ -генов предназначены для формирования HCAb (мутация приводит к потере CH1-домена), в то время как остальные - для формирования классических антител (с сохраняемым CH1-доменом). Одни и те же гены сегментов D и J могут случайным образом соединяться как с одним из  $V_H$ -, так и с одним из  $V_{HH}$ -генов. Это указывает на то, что гены  $V_H$  и  $V_{HH}$  находятся в одном и том же локусе [7-10].

Организация переменных доменов неканонических антител ( $V_{HH}$ ) и переменных доменов ( $V_H$ ) классических антител весьма сходна, так как у человека  $V_H$ -домены подкласса IgG3 имеют особо выра-

женную гомологию с  $V_H$  и  $V_{HH}$  верблюдовых. В обоих случаях V-домены состоят из четырех консервативных каркасных участков FR, которые окружают три гипервариабельных участка, определяющих комплементарность, CDR. Также в обоих случаях формируется типичная для V-домена иммуноглобулина пространственная структура из двух  $\beta$ -слоев, один из которых состоит из четырех аминокислотных цепочек и второй - из пяти [11, 12]. В этой структуре все три гипервариабельных участка кластеризуются с одной стороны V-домена, где они участвуют в распознавании антигена и располагаются в петлях, соединяющих  $\beta$ -структуры. Однако имеются и важные отличия, связанные с функционированием  $V_{HH}$  в формате одного домена. Так, гипервариабельные участки CDR1 и CDR3  $V_{HH}$  заметно увеличены. Часто в гипервариабельных участках  $V_{HH}$  обнаруживаются цистеиновые остатки сразу в двух участках (чаще всего - в CDR1 и CDR3, реже - в CDR2 и CDR3). При исследовании кристаллических структур  $V_{HH}$  показано, что эти цистеиновые остатки формируют дисульфидные связи, и это дополнительно стабилизирует структуру петель данного антитела [12]. Наиболее явный и воспроизводимый отличительный признак  $V_{HH}$  - четыре замены гидрофобных аминокислотных остатков на гидрофильные во втором каркасном участке (Val37Phe, Gly44Glu, Leu45Arg, Trp47Gly, согласно нумерации Kabat и соавт. [13]). Этот каркасный участок у  $V_H$ -домена высококонсервативен, обогащен гидрофобными аминокислотными остатками и особо важен при образовании связи с вариабельным доменом  $V_L$  легкой цепи. В этом аспекте  $V_{HH}$ -домен сильно отличается: указанные замены гидрофобных аминокислот на гидрофильные делают невозможной ассоциацию  $V_{HH}$  и  $V_L$ . Эти замены также объясняют обычно высокую растворимость  $V_{HH}$  (нано-антитела) при его получении в виде рекомбинантного белка [14].

Репертуары возможных паратопов (антигенсвязывающих структур антитела) HCAb и классических антител, по-видимому, могут заметно отличаться. Так как эти два типа антител сосуществуют в одном организме, то можно предполагать, что они не конкурируют, а взаимно дополняют друг друга. Действительно, не раз отмечалось, что оба типа антител могут возникать параллельно, взаимоисключаяще или в разных соотношениях, по отношению к разным эпитопам антигенного материала при иммунизации одного и того же животного. Несмотря на предполагаемое меньшее разнообразие возможных паратопов у однодоменных антител по сравнению с классическими двухдоменными антителами, работы многих авторов убедительно продемонстрировали, что HCAb могут быть получены против самых разнообразных эпитопов весьма широкого спектра антигенов [15]. Очевидно, этому способствуют заметно увеличенные гипервариабельные участки CDR1 и CDR3. Следует также отметить удивительно большое (в сравнении с V-доменами классических антител) число соматических гипермутаций в  $V_{HH}$ , накапливающихся, по-видимому, в процессе аффинного созревания антител в ходе иммунизации [16]. Рентгеноструктурный анализ показал, что антигенсвязывающие петлевые участки  $V_{HH}$  способны образовывать необычные для классических V-доменов структуры [12, 16]. Если в случае  $V_H$ - и  $V_L$ -доменов классических антител все шесть гипервариабельных участков вносят более или менее одинаковый вклад в связывание антигена, то в случае  $V_{HH}$  обычно для формирования паратопа более важен CDR3-участок. Показано, что CDR3-участок в  $V_{HH}$  (но не в  $V_H$  или  $V_L$ ) может образовывать необычные длинные пальцеобразные выступающие структуры, которые могут углубляться в структуру антигена, в частности, распознавать активные центры ферментов [12]. Малыми размерами антигенсвязывающего участка ( $V_{HH}$ ) и его способностью формировать необычные выступающие паратопы объясняется возможность получения HCAb, способных распознавать недоступные для классических антител эпитопы, например, при образовании антител, являющихся эффективными ингибиторами ферментов [17].

При всем своем высоком потенциале уникальной, в сравнении с классическими IgG антителами, специфичности использование монодоменных  $V_{HH}$  для терапевтического применения в ряде случаев ограничено из-за быстрого выведения этой малой молекулы из организма. Существует ряд решений по улучшению фармакокинетики  $V_{HH}$  структур, которые включают использование химической конъюгации с ПЭГ (PEG) и ковалентное соединение с полипептидом, опосредующим уменьшенный клиренс из крови, такими как сывороточный альбумин человека (HSA) и Fc-фрагмент классического антитела человека, в виде гибридных белков, период полувыведения в крови которых составляет до трех недель [18-20]. Также показано успешное применение малых пептидов, присоединяемых с помощью методов генной инженерии к  $V_{HH}$  и способных к высокоаффинному нековалентному взаимодействию с этими же компонентами (HSA и IgG) в крови человека [21]. Однако технологичность и иммуногенность этих подходов остаются пока неясными и находятся только на стадии проверки применимости как в клинических исследованиях так и на более ранних стадиях исследований.

Кроме того, наибольшее ограничение при применении антител в качестве препаратов для лечения различных заболеваний накладывает агрегационная и химическая стабильность, аффинность и иммуногенность. Так как большинство моноклональных антител в настоящее время получают на основе мышинных, применение таких антител у пациентов приводит к развитию иммунного ответа на терапию антителами, например аллергических реакций. Такие типы иммунного ответа могут повлечь за собой в конечном итоге потерю эффективности при лечении по меньшей мере и в худшем случае к возможным тяжелым анафилактическим реакциям. С другой стороны, агрегационно или химически нестабильные терапевтические антитела при хранении препарата ухудшают его терапевтические свойства и могут усили-

вать иммуногенность при введении в организм пациента.

В связи с вышесказанным актуальным является создание антител на основе антител  $V_{HH}$ , которые имели бы по сравнению с известными ранее антителами улучшенные функциональные и терапевтические свойства, в частности повышенную агрегационную, химическую и термостабильность и улучшенную аффинность, и в то же время отличались бы легкостью и простотой получения, в том числе и в промышленно значимых масштабах.

#### Предшествующий уровень техники

Из предшествующего уровня техники известны различные конструкции антител, содержащие  $V_{HH}$  домен в своем составе.

В публикации PCT/EP2008/066368 описаны антитела, которые содержат отдельные переменные домены, связанные с Fc-фрагментом. В качестве переменных доменов могут быть использованы "нано-тела", при этом Fc-фрагмент получен из антитела типа IgE. Указанные Fc-фрагмент и домен могут соединяться через линкер, расположенный в шарнирной области.

В заявке на патент US 2009/0202979 раскрыты антитела, включающие полностью или часть антител  $V_{HH}$ , непосредственно соединенные с константными частями человеческих антител.

Также известны аминокислотные замены, влияющие на физико-химические и биологические свойства антител.

Например, в заявке US 20110028348 описаны переменные домены тяжелых цепей антитела, в которых введены аминокислотные замены в позициях 35, 45, 47, 93- 100 и 100a для повышения гидрофильности получаемого антитела.

К настоящему времени разработаны методы оптимизации структуры изолированных  $V_{HH}$  и  $V_H$  доменов, уменьшающие их иммуногенность и улучшающие агрегационную стабильность.

Так, Vincke и соавторы [22] обнаружили, что замены Glu-49→Gly и Arg-50→Leu в характерных аминокислотах приводят к получению отдельного домена, который является более стабильным, но при этом менее растворимым. Другие замены в каркасном участке FR-2 Phe-42→Val и Gly/Ala-52→Trp критично влияют на аффинность антитела к антигену вследствие переориентации петли H3, повышая константу его кинетической диссоциации в 6-10 раз ( $6,85 \times 10^{-3}$  1/с). При замене Phe-42→Val наблюдалось снижение стабильности получаемых антител. Замена Gly-49 и Leu-50 в  $V_H$  последовательности приводила к снижению стабильности домена, в то время как гуманизация по Glu-49 и Arg-50 в  $V_{HH}$  позволяла получить стабильные переменные домены.

Из литературы также известно, что при наличии коротких HCDR3 регионов, нивелирующих экраняющий эффект конформации классических  $V_{HH}$ , и внесении  $V_H$ -характерной замены Trp-47 на Gly-47 и замен Tyr-37 на Val-37, Glu-44 на Gly-44 и Arg-45 на Leu-45, изолированные  $V_{HH}$ -домены могут восстанавливать способность к связыванию с  $V_L$ -доменами [24].

Связь между повышением агрегационной стабильности терапевтических антител классической IgG структуры и снижением их иммуногенности подкреплена результатами работ многих авторов и рассмотрена в обзоре Hermeling et al., 2004 [25]. Однако не было обнаружено антител, имеющих в своем составе производные  $V_{HH}$ -доменов, но связанных с переменными доменами легких цепей в составе полноразмерных иммуноглобулинов человека класса IgG.

Таким образом существует, необходимость в создании нового формата антител, которые при этом обладали бы повышенной стабильностью и аффинностью, отличались хорошей экспрессией и имели бы низкую иммуногенность.

Кроме того, ранее не описано подходов к созданию подобных молекул с улучшенной агрегационной стабильностью и повышенной аффинностью и высоким уровнем экспрессии в клеточных культурах млекопитающих и легкостью в получении.

В связи с вышесказанным данное изобретение впервые описывает формат антител, включающих производные  $V_{HH}$ -доменов, способных связываться с переменными доменами легких цепей в составе полноразмерных иммуноглобулинов человека класса IgG с образованием сходной с природной и, следовательно, обладающей низкой иммуногенностью, но в то же время улучшенной агрегационной стабильностью и повышенной аффинностью, и имеющих структуру терапевтического моноклонального антитела.

#### Описание фигур

Фиг. 1. Схема создания и оптимизации агрегационно стабильного антитела на основе  $V_{HH}$ .

Фиг. 2-4. SDS-гель-электрофорез SDS-гель-электрофорез антител  $V_{HH}$  IgG1 с различными аминокислотными заменами.

Фиг. 5. Схема синтеза комбинаторной библиотеки Fab ламы.

Фиг. 6. Фагмида для клонирования Fab фаговых дисплейных библиотек.

Фиг. 7. А - Последовательности переменных доменов  $V_{HH}$  ламы в составе Fab, специфичных против IL-17A человека. В - Последовательности переменных доменов легких цепей ламы в составе  $3V_{HH}$ Fab, специфичных против IL-17A человека.

Фиг. 8. Сенсограммы проверки сравнительных кинетических характеристик  $V_{HH}$ Fab клонов по свя-

зыванию с IL-17A.

Фиг. 9. Аминокислотные последовательности различных трех мутантов  $V_{HH}$ .

Фиг. 10, 11. Агрегационная стабильность трех мутантов  $V_{HH}$ .

Фиг. 12, 13. Свойства аффинности трех мутантов  $V_{HH}$ .

Фиг. 14. Клеточный тест блокирования продукции IL-6 путем ингибирования IL-17A антагонистами  $V_{HH}IgG1VK4B11$ ,  $mut1V_{HH}IgG1$  и  $mut4V_{HH}IgG1$ .

Фиг. 15, 16. Выделение химерных вариантов  $mut4V_{HH}Fab$ , содержащие легкие цепи человека.

Фиг. 17. Клеточный тест блокирования продукции IL-6 путем ингибирования IL-17A антагонистами  $mut4V_{HH}IgG1VK3c8$ ,  $mut4V_{HH}IgG1VK1A7$  и  $mut4V_{HH}IgG1VK4E12$ .

Фиг. 18, 19. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях препаратов, содержащие антитела с мутациями в позициях 44 и 45  $m4V_{HH}c8$ .

Фиг. 20. Сравнительный клеточный тест блокирования продукции IL-6 путем ингибирования IL-17A антагонистами  $m4V_{HH}c8$  с мутациями в позициях 44 и 45 в FR2.

Фиг. 21. Диаграмма стабильности и функциональных свойств для различных мутаций 44 и 45 позиций в регионе FR2  $m4V_{HH}c8$ , определяющих взаимодействия переменного домена тяжелой и легкой цепей.

Фиг. 22. Определение кинетических параметров взаимодействия BCD 109 к IL-17A из различных видов организмов (на приборе Octet RED 96).

Фиг. 23. Результаты по исследованию кинетических параметров взаимодействия BCD 109 к IL17A из различных видов организмов (на приборе Octet RED 96).

Фиг. 24. Хроматограмма антитела BCD 109, полученная до и после проведения термостресса.

### Определения

"Моноклональное антитело", как используется в данном документе, относится к антителу ламы, химерному антителу, гуманизированному антителу или полностью человеческому антителу, если в данном документе не указано иное. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены с использованием, например, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий или комбинаций таких технологий или других технологий, хорошо известных из уровня техники.

"Моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из единой копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу его получения. "Моноклональное антитело" может быть интактным антителом (содержащим полный или полно-размерный Fc-участок), по существу интактным антителом, частью или фрагментом антитела, содержащими антиген связывающую часть, например Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент ламы или химерного, гуманизированного или человеческого антитела. "Fab"-фрагмент содержит переменный и константный домен легкой цепи и переменный домен и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. "F(ab')<sub>2</sub>"-фрагменты антитела содержат пару Fab-фрагментов, которые в основном ковалентно связаны возле их C-концов шарнирными цистеинами между ними. Другие химические связывания фрагментов антител также хорошо известны из уровня техники.

Кроме того, "моноклональное антитело", как используется в данном документе, может быть одноцепочечным Fv-фрагментом, который может быть получен путем связывания ДНК, кодирующей  $V_{HH}$  и  $V_L$ , с линкерной последовательностью. До тех пор пока белок сохраняет способность специфического или предпочтительного связывания своей мишени (например, эпитопа или антигена), он относится к термину "антитело". Антитела могут быть гликозилированными или не быть таковыми и входят в рамки изобретения.

Термин "производное" или "вариант" антитела в контексте данного описания относится к молекуле, аминокислотная последовательность которой отличается от аминокислотной последовательности "родительского" антитела путем добавления, делеции и/или замещения одного или более аминокислотных остатков в последовательности родительского антитела. В предпочтительном из вариантов осуществления вариантное антитело содержит по крайней мере одну аминокислотную (например, от 1 до приблизительно 10 и предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 замен) замену в FR- или CDR-участках родительского антитела. Идентичность или гомологичность относительно последовательности вариантного антитела определена в данном документе как процент аминокислотных остатков в последовательности вариантного антитела, идентичный остаткам родительского антитела, после выравнивания последовательностей и введения разрывов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности.

Производное (от родительского) антитело сохраняет способность связывать антиген или предпочтительно эпитоп, с которым связывается родительское антитело или предпочтительно имеет по крайней мере одно свойство или биологическую активность, которая превосходит аналогичные свойства родительского антитела. Например, антитело предпочтительно обладает большей агрегационной стабильностью или сильной аффинностью связывания, улучшенными фармакокинетическими свойствами или повышенной способностью ингибировать биологическую активность антигена, чем родительское антитело.

Термин " $V_{HH}$  производное" в контексте данного описания относится к производным  $V_{HH}$  антител,

чья аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности "родительского"  $V_{HH}$  антитела путем замещения одного или более аминокислотных остатков в последовательности родительского антитела. В предпочтительном из вариантов осуществления производное  $V_{HH}$  антитело содержит по крайней мере одну аминокислотную (например, от 1 до приблизительно 20 и предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) замену в FR- или CDR-участках родительского антитела.

Производное антитело сохраняет способность связывать антиген или предпочтительно эпитоп, с которым связывается родительское антитело или предпочтительно имеет по крайней мере одно свойство или биологическую активность, которая превосходит аналогичные свойства родительского антитела. Например, антитело предпочтительно обладает большей агрегационной стабильностью или сильной аффинностью связывания, улучшенными фармакокинетическими свойствами или повышенной способностью ингибировать биологическую активность антигена, чем родительское антитело.

"Родительское  $V_{HH}$  антитело" или "исходное  $V_{HH}$  антитело" или "дикое  $V_{HH}$  антитело" в контексте данного описания относится к  $V_{HH}$  антителу, выделенному из иммунизированного или неиммунизированного животного семейства верблюдовых и кодированному аминокислотной последовательностью, которая используется для получения  $V_{HH}$  производного. Родительское антитело может иметь каркасную последовательность происхождения из семейства верблюдовых в части варибельного домена  $V_{HH}$ , но предпочтительно каркасная последовательность варибельного домена легкой цепи имеет полностью или по существу человеческое происхождение.

"Родительское" или "исходное" или "дикое" антитело в контексте данного описания представляет собой антитело, кодированное аминокислотной последовательностью, которая используется для получения варианта. Родительское антитело может иметь каркасную последовательность происхождения из семейства верблюдовых в части варибельного домена  $V_{HH}$ , но предпочтительно каркасная последовательность варибельного домена легкой цепи имеет полностью или по существу человеческое происхождение.

Термин "специфически связывает", как используется в данном документе, относится к той ситуации, при которой один участник пары специфического связывания не связывает в значительной степени молекулы, отличные от его партнера (партнеров) по специфическому связыванию. Термин также применим, когда, например, антигенсвязывающий домен антитела по изобретению является специфическим для конкретного эпитопа, который переносится рядом антигенов, в таком случае специфическое антитело, имеющее антигенсвязывающий домен, будет способно к специфическому связыванию различных антигенов, несущих эпитоп. Соответственно, моноклональное антитело по изобретению специфически связывает IL-17 человека (т.е. IL-17A), в то время как оно специфически не связывает человеческие IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E. Более того, моноклональное антитело по изобретению специфически связывает IL-17 человека и IL-17 макаки-крабоеда, но специфически не связывает IL-17 крысы или IL-17 мыши.

Термин "предпочтительно связывает", как используется в данном документе, относится к ситуации, в которой антитело связывает специфический антиген по крайней мере приблизительно на 20% больше, предпочтительно по крайней мере приблизительно на 50% и в 2, 20, 50 или 100 раз больше, чем оно связывает иной антиген в соответствии с измерениями, проведенными по методикам, известным из уровня техники, например, конкурентного анализа ELISA или  $K_D$  измерений при помощи анализатора Octet прибора. Антитело может предпочтительно связывать один эпитоп в пределах антигена, а не другой эпитоп в пределах того же самого антигена. Соответственно, антитело по изобретению предпочтительно связывает IL-17 человека, но не IL-17 кролика.

Термин "эпитоп" относится к той части молекулы, которая способна распознаваться и связываться с антителом в одном или более антигенсвязывающих участках антитела. Эпитопы часто состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обладают определенными трехмерными структурными характеристиками. Под "ингибирующим эпитопом" и/или "нейтрализующим эпитопом" подразумевается эпитоп, который в контексте интактной антигенной молекулы и при связывании антителом, специфическим к эпитопу, приводит к утрате или к уменьшению биологической активности молекулы или организма, который содержит молекулу, *in vivo* или *in vitro*.

Термин "эпитоп", как используется в данном документе, кроме того, относится к части полипептида, которая обладает антигенной и/или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно млекопитающего, например мыши или человека. Термин "антигенный эпитоп", как используется в данном документе, является частью полипептида, с которой может специфически связываться антитело, определенная любым способом, хорошо известным из уровня техники, например при помощи традиционного иммунного анализа. Антигенные эпитопы необязательно должны быть иммуногенными, но могут также быть иммуногенными. "Иммуногенный эпитоп", как используется в данном документе, определяется как часть полипептида, который вызывает отклик антитела у животного, как устанавливается любым способом, известным из уровня техники. "Нелинейный эпитоп" или "конформационный эпитоп" содержит несмежные полипептиды (или аминокислоты) в пределах антигенного протеина, с которым антитело, специфическое к эпитопу, связывается.

Выражения "функциональная активность" или "функциональная характеристика" или термины "биологическая активность" или "биоактивность" по отношению к антителу по изобретению используются в данном документе как взаимозаменяемые и включают, но не ограничиваются приведенными, эпитоп/антигенную аффинность и специфичность, способность нейтрализовать или быть антагонистом активности IL-17 *in vivo* или *in vitro*, IC<sub>50</sub>, стабильность антитела и иммуногенные свойства антитела *in vivo*. Остальные идентифицируемые из уровня техники биологические свойства или характеристики антитела включают, например, перекрестную реактивность (т.е. с нечеловеческими гомологами белка-мишени или с остальными белками или даже клетками, в общем) и способность сохранять высокие уровни экспрессии протеина в клетках млекопитающих. Вышеуказанные свойства или характеристики могут измеряться или оцениваться с использованием методик, включая, но не ограничиваясь приведенными, анализ ELISA, конкурентный анализ ELISA, Octet анализа, анализы нейтрализации *in vitro* или *in vivo* без ограничений, рецепторного связывания, продуцирования и/или секреции цитокина или фактора роста, сигнальную трансдукцию и иммуногистохимию срезов тканей, полученных из различных источников, включая человека, примата или любой другой источник.

Популяция "моноклональных антител" относится к гомогенной или по существу гомогенной популяции антител (т.е. по крайней мере приблизительно 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96%, более предпочтительно по крайней мере приблизительно 97 или 98% или еще более предпочтительно по крайней мере 99% антител в популяции будут конкурировать в анализе ELISA за тот же антиген или эпитоп, или более предпочтительно антитела являются идентичными в аминокислотной последовательности).

Полноразмерное антитело, существующее в природе, представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая состоит из четырех пептидных цепей, две тяжелые (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа при полной длине) и две легкие (L) цепи (приблизительно 25 кДа при полной длине), взаимосвязанных дисульфидными мостиками. Аминоконцевая часть каждой цепи включает переменный домен из приблизительно 100-110 или более аминокислот, которые отвечают за связывание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константный участок, главным образом, отвечающий за функцию эффектора. Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда, и они характеризуются конкретным константным участком. Каждая легкая цепь состоит из переменного участка N-концевой легкой цепи (в данном документе "V<sub>L</sub>" или "V<sub>K</sub>") и константного участка легкой цепи, состоящего из одного домена, C<sub>L</sub> или C<sub>K</sub>. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и они определяют изотип антитела, такой как IgG, IgM, IgE IgA и IgD соответственно, и несколько из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1. Каждый тип тяжелой цепи характеризуется конкретным константным участком. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка N-концевой тяжелой цепи (в данном документе "V<sub>H</sub>") и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов (CH1, CH2 и CH3) для IgG, IgD и IgA и четырех доменов (CH1, CH2, CH3 и CH4) для IgM и IgE. Переменные домены V<sub>H</sub>, V<sub>H1</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно разделены на участки гипервариабельности, названные гипервариабельными участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, названными каркасными участками (FR). Каждый переменный домен состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в следующем порядке от N-конца к C-концу: FR1, CDR1, FFL2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В данном документе три CDR тяжелых цепей обозначены как "HCDR1, HCDR2 и HCDR3", а три CDR легких цепей обозначены как "LCDR1, LCDR2 и LCDR3". CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. Нумерацию и позиционирование CDR-аминокислотных остатков осуществляют по Kabat номенклатуре.

Термин "антиген" относится к мишени антигена, против которой антитело может быть иммунореактивным, используется в контексте данного описания в своем традиционном понятии, как его используют специалисты в данной области техники, и включает, среди прочих, полипептиды, пептиды, полисахариды, гликопротеины, полинуклеотиды (например, ДНК) или химические антигены, рецепторы, интерлейкины. Интерлейкины могут включать в себя интерлейкины разных групп, в том числе интерлейкин 1 (альфа и бета), интерлейкин 2, интерлейкин 3, интерлейкин 4, интерлейкин 5, интерлейкин 6, интерлейкин 7, интерлейкин 8, интерлейкин 9, интерлейкин 10, интерлейкин 11, интерлейкин 17, интерлейкин 18, интерлейкин 33.

Термин "антиген" также может использоваться для описания материала, используемого для иммунизации животных (например, лам) при продуцировании антител согласно изобретению. В этом контексте "антиген" может иметь более широкое значение, и может охватывать очищенные формы антигена, и также неочищенные или не полностью выделенные или очищенные препараты антигена, такие как, например, клетки, лизаты клеток или супернатанты, фракции клеток, например клеточные мембраны и т.д. с добавлением гаптенных, конъюгированных с соответствующим носителем белка. Антиген, используемый в процессе иммунизации, необязательно означает антиген, структурно идентичный мишени антигена, с которым в результате антитело согласно изобретению может связываться. Как правило, антиген, используемый для иммунизации, может представлять собой усеченный вариант мишени антигена, например фрагмент, содержащий иммуногенный эпитоп. Более подробные характеристики антигенов, используемых для иммунизации, описаны в литературе и могут быть хорошо известны специалисту в дан-

ной области техники.

Вариабельные участки каждой из пар легкая/тяжелая цепь образуют антигенсвязывающие сайты антитела. Таким образом, интактное IgG антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител два сайта связывания являются одинаковыми. Как используется в данном документе, "антигенсвязывающая часть", или "антигенсвязывающий участок", или "антигенсвязывающий домен" относятся, взаимозаменяемо, к такой части молекулы антитела, которая содержит аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном и обуславливающие специфичность и аффинность антитела по отношению к антигену. Такая часть антитела включает "каркасные" аминокислотные остатки, необходимые для поддержания надлежащей конформации антигенсвязывающих остатков.

Предпочтительно CDR антигенсвязывающего участка  $V_{HH}$  или весь антигенсвязывающий участок антител по изобретению полностью происходит от семейства верблюдовых или по существу происходит от семейства верблюдовых, содержит определенные аминокислотные остатки, измененные, например, замещенные разными аминокислотными остатками (см., например, табл. 6) с тем, чтобы оптимизировать конкретные свойства антитела, например  $K_D$ ,  $k_{off}$ ,  $IC_{50}$ . Предпочтительно каркасные участки антитела по изобретению имеют происхождение от семейства верблюдовых или человека или по существу человеческое происхождение (по крайней мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% человеческое происхождение) и соответствуют номенклатуре Kabat.

"Фрагмент антитела" может представлять собой фрагмент антитела или фрагмент антитела, имеющий активность полноразмерного антитела. Указанный фрагмент антитела может представлять собой  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fab$ ,  $Fv$  и  $scFv$ .

"Интерлейкин 17", или также "IL-17" или "IL-17A", является гомодимерным белком с массой 20-30 кДа. Ген IL-17A человека кодирует 155-аминокислотный протеин, который имеет 19-аминокислотную сигнальную последовательность и 136-аминокислотный зрелый сегмент. Аминокислотная последовательность IL-17A человека на 80, 63 и 58% идентична аминокислотным последовательностям кролика, мыши и крысы соответственно. Аминокислотная последовательность IL-17A человека на 97% идентична последовательности интерлейкина-17A макаки-крабоеда.

Термин "антитело" при употреблении в связи с анти-IL-17 моноклональным антителом по изобретению (либо упрощенно, "моноклональное антитело по изобретению"), как используется в данном документе, относится к моноклональному антителу.

Термин "ингибировать" или "нейтрализовать", как используется в данном документе, по отношению к функциональной активности антитела по изобретению, означает способность в значительной степени препятствовать, предотвращать, ограничивать, замедлять, прекращать, уменьшать или обращать, например, развитие или тяжесть того, что ингибируют, включая, но не ограничиваясь вышеприведенными, биологическую активность (например, активность IL-17) или свойство, заболевание или состояние. Ингибирование или нейтрализация активности IL-17 в результате связывания антитела по изобретению с IL-17 составляет предпочтительно по крайней мере приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или выше.

Термин "выделенный" или "изолированный" при использовании по отношению к нуклеиновой кислоте или белковому препарату (например, антителу) относится к молекуле нуклеиновой кислоты или белковой молекуле, которые идентифицируют и отделяют по крайней мере от одного контаминантного вещества, с которым она обычно связана в природном источнике. Предпочтительно "выделенное антитело" является антителом, которое по существу не содержит другие антитела, обладающие отличительной антигенной специфичностью (например, фармацевтические композиции согласно изобретению содержат выделенное антитело, которое специфически связывает IL-17 и по существу не содержит антитела, которые специфически связывают антигены, отличные от IL-17).

Термины "Kabat номенклатура" или "номенклатура по Kabat" применяются в данном документе к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем остальные аминокислотные остатки в вариабельных участках тяжелой и легкой цепи антитела (Kabat et al., Ann. NY Acad. Sci., 190:382-93 (1971); Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

Полинуклеотид является "функционально связанным", если он имеет функциональные связи с другим полинуклеотидом. Например, промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию последовательности. Полипептид "функционально связан" с другим полипептидом, если полинуклеотиды, кодирующие их, связаны функционально, предпочтительно, если они находятся в той же открытой рамке считывания.

Термин "конструкция ДНК" в контексте данного описания относится к ДНК или ее фрагменту, кодирующей антитело согласно изобретению. Обычно ДНК или ее фрагмент, который кодирует антитело, например описанное в настоящей заявке, функционально (операбельно) связывают в рамке считывания по меньшей мере с одним другим фрагментом ДНК, кодирующим дополнительный полипептид (например, домен или район из рецептора другого цитокина, такого как IL-2-рецептор), и встраивают в подхо-

дящий экспрессирующий вектор. Обычно конструкции ДНК конструируют таким образом, что несколько фрагментов ДНК, кодирующих соответствующие сайты антителя, функционально связывают в рамке считывания для получения единой конструкции, кодирующей полностью антители или его функциональный фрагмент. Например, конструкция ДНК кодировала бы от N-конца до C-конца антителя. Такие антители могут быть экспрессированы, выделены и исследованы на активность.

Термины "вектор", "плазмида" относятся к нуклеиновым кислотам, полученным синтетическим путем и методами генной инженерии и содержат определенный, известный в данной области, набор функциональных элементов последовательности. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены, в то время как остальные векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и, реплицироваться вместе с геномом-хозяином. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы имеют в данном документе название "векторы для рекомбинантной экспрессии" (или, упрощенно, "экспрессионные векторы"). Примеры таких векторов хорошо известны из уровня техники.

Как используется в данном документе, термины "клетка", "клетка-хозяин", "линия клеток" и "клеточная культура" используются как взаимозаменяемые и включают индивидуальную клетку или клеточную культуру, являющиеся реципиентом любого выделенного полинуклеотида по изобретению или любого рекомбинантного вектора (любых рекомбинантных векторов), которые содержат последовательность антителя по изобретению. Клетки-хозяева включают потомство индивидуальной клетки-хозяина, и потомство может необязательно быть полностью идентичным (по морфологии или полному ДНК комплексу) оригинальной родительской клетке из-за природных, случайных или преднамеренных мутаций и/или изменений. Клетка-хозяин включает клетки, трансформированные, трансдуцированные или инфицированные рекомбинантным вектором, или моноклональное антители, которое экспрессирует полинуклеотид по изобретению или его легкую или тяжелую цепь. Клетка-хозяин, которая содержит рекомбинантный вектор по изобретению (как стабильно включенный в хромосом-хозяин, так и не включенный), также может называться рекомбинантной клеткой-хозяином. Предпочтительными клетками-хозяевами для использования в изобретении являются CHO клетки (например, ATCC CRL-9096), NS0 клетки, SP2/0 клетки, COS клетки (ATCC, например, CRL-1650, CRL-1651) и HeLa (ATCC CCL-2). Дополнительные клетки-хозяева для использования в изобретении включают растительные клетки, дрожжевые клетки, другие клетки млекопитающих и прокариотические клетки.

Термин "специфическое связывание" между антителим и мишенью антигена (антигеном) относится к иммунологической специфичности.

Антители могут специфически связываться с мишенью антигена, если оно связывает эпитоп на антигене в большей степени, чем другие эпитопы на антигене. Специфическое связывание не исключает кросс-реактивность с другими антигенами, несущими сходные эпитопы антигенов.

$V_L$  домены в антителях согласно изобретению могут быть типа  $V_L$  лямбда, или  $V_L$  каппа. Термин " $V_L$  домен" относится к обоим изотипам  $V_K$  каппа и  $V_L$  лямбда, которые содержат одну или более аминокислотных замен, инсерций или делеций.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции и/или составу, содержащему антители согласно изобретению в терапевтически эффективном количестве и вспомогательные вещества (эксципиенты, разбавители, наполнители, растворители и вспомогательные вещества, например.).

Термин "применение" или "способ лечения" относится к возможности применения антителя согласно изобретению или фармацевтической композиции, его содержащей, для лечения, облегчения течения заболеваний, для ускорения ремиссии, снижения частоты рецидивов вследствие заболеваний или нарушений, опосредуемых рецепторами, с которыми может связываться антители согласно изобретению.

#### Описание изобретения

Согласно настоящему изобретению, предложены гуманизированные моноклональные антители, предпочтительно типа IgG, обладающие повышенной аффинностью и улучшенной агрегационной стабильностью, в котором переменные домены представлены комбинацией производного  $V_{HH}$  с переменным доменом легкой цепи  $V_L$ .

В одном из вариантов реализации производное  $V_{HH}$  антителя согласно изобретению может содержать аминокислотные замены в позициях  $44X_245X_3$ , где  $X_2 = G, A, V, S, T$ ; а  $X_3 = A, V, T, H$  или их комбинации, а 44 и 45 обозначают позиции для аминокислотных замен. Здесь и далее в тексте при указании позиции для аминокислотной замены применяется система нумерации по Kabat (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

В другом варианте реализации антители согласно изобретению имеет повышенную агрегационную стабильность производного  $V_{HH}$  в сравнении с исходным IgG антителим, содержащим  $V_{HH}$ , выделенным из иммунизированного животного, при этом указанным животным может быть животное семейства Camelidae.

В еще одном варианте реализации изобретения антители включает производное  $V_{HH}$ , которое представляет собой переменный домен тяжелой цепи антителя, выделенный из иммунизированного животного семейства Camelidae. При этом производное  $V_{HH}$  может иметь дополнительные аминокислотные замены, характерные для человека в любых позициях, исключая указанные следующие аминокислотные

замены в позиции 44 и 45:

- a) 44X<sub>2</sub>, где X<sub>2</sub> = G, A, V, S, T;
- b) 45X<sub>3</sub>, где X<sub>3</sub> = A, V, T, H;

или их комбинации.

В еще одном варианте реализации антители согласно изобретению включает производное V<sub>HH</sub>, которое может представлять собой вариабельный домен тяжелой цепи, выделенный из неиммунизированного животного группы Camelidae. При этом производное V<sub>HH</sub> может иметь дополнительные аминокислотные замены, характерные для человека в любых позициях, исключая указанные следующие аминокислотные замены в позиции 44 и 45:

- a) 44X<sub>2</sub>, где X<sub>2</sub> = G, A, V, S, T;
- b) 45X<sub>3</sub>, где X<sub>3</sub> = A, V, T, H;

или их комбинации.

В еще одном варианте реализации антители согласно изобретению включает вариабельный домен легкой цепи V<sub>L</sub>, который является производным антителя человека. В дополнительном варианте реализации вариабельный домен легкой цепи V<sub>L</sub> является гуманизированным фрагментом антителя животного.

В другом варианте реализации антители согласно изобретению включает производное V<sub>HH</sub>, которое содержит цистеин в позиции 44 согласно номенклатуре Kabat, а вариабельный домен легкой цепи V<sub>L</sub> содержит цистеин в позиции 100 согласно номенклатуре Kabat.

В еще одном варианте реализации изобретения антители представляет собой антители любого из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В другом варианте реализации антители согласно изобретению содержит неприродный модифицированный фрагмент Fc в составе IgG.

В еще одном варианте реализации антители согласно изобретению имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и хранении при T=4°C в течение более чем 6 месяцев содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе. В дополнительном варианте реализации антители имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до 37°C в течение более чем 2 недели содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе. В еще одном дополнительном варианте реализации антители имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до 42°C в течение более чем 48 ч содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе. В другом дополнительном варианте реализации антители имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и повышении температуры до 50°C в течение более чем 6 ч содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе.

В одном варианте реализации антители имеет константу диссоциации K<sub>D</sub> не более 10<sup>-9</sup> М. В дополнительном варианте реализации антители имеет кинетическую константу ассоциации с антигеном k<sub>on</sub>(1/Мс) не менее 10<sup>5</sup> 1/Мс. В другом дополнительном варианте реализации антители имеет кинетическую константу диссоциации с антигеном dis(1/с) не более 10<sup>-4</sup> 1/с.

В одном варианте реализации согласно изобретению предложен фрагмент антителя. При этом фрагмент антителя может представлять собой легкую цепь, тяжелую цепь, вариабельные домены легкой и/или тяжелой цепи, являющиеся частью последовательности антителя, в том числе и биспецифического варианта антителя. В еще одном варианте реализации фрагмент антителя может представлять собой легкую цепь, тяжелую цепь, вариабельные домены легкой и/или тяжелой цепи, являющиеся компонентами Fab-фрагмента. В другом варианте реализации фрагмент антителя может представлять собой легкую цепь, тяжелую цепь, вариабельные домены легкой и/или тяжелой цепи, являющиеся компонентами scFv-фрагмента.

Согласно изобретению также предложены способы получения антителя согласно изобретению. Указанный способ получения антителя может включать стадии, выбранные из следующих: направленный мутагенез, дисплейные методы, методы геномной инженерии, биохимии и высокопроизводительных биотехнологических методов, известных в данной области, которые могут также включать методы направленного мутагенеза V<sub>HH</sub> домена антителя семейства Camelidae в различных позициях.

Кроме того, согласно изобретению предложена конструкция ДНК, кодирующая антители согласно изобретению или его фрагмент. Также предложен экспрессионный вектор, содержащий одну или несколько конструкций ДНК согласно изобретению.

Также в другом аспекте изобретения предложена клеточная линия, которая содержит в клетках экспрессионный вектор или конструкцию ДНК, указанные ранее.

Дополнительно, согласно изобретению предложен способ получения гуманизированного моноклонального антителя или его фрагмента, который включает культивирование клеточной линии в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антителя или его фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антителя или его активного фрагмента.

Кроме того, согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его фрагмент антитела, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями. Более подробно технологии получения композиций описаны в специальных руководствах по биотехнологии, например, [25].

В еще одном варианте реализации изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, или его фрагмент в составе активной молекулы, содержащий производное переменного домена тяжелой цепи ( $V_{\text{H}}$ ) антител животных семейства Camelidae который содержит

а) три гипервариабельных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где:

HCDR1 включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1:

G-T-F-A-T-X32-X33-X34-X35 (согласно номенклатуре Kabat),

где X32 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей S, N, K, R, E, W, Q, D, A, V и F;

X33 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей P или S;

X34 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей M и I;

X35 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, N, S, A, L, I, R, V и Q;

HCDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2:

X50-I-X52-X52a-S-G-X55-D-R-I-Y-A-D-S-V-K-G,

где X50 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей A, G и L;

X52 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей S, D и E;

X52a представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей P и A;

X55 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, S, T, L, R, D, E, K, A и W;

HCDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3:

C-A-X94-X95-X96-X97-F-X99-X100-X100a-X100b-X100c-X100d-X100e-X100f-D-Y-D-S,

где X94 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей K, S, T, V, D и G;

X95 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей R и K;

X96 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, R, Y, H, D, W и K;

X97 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей R, A, V, S, L и H;

X99 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей D, E, G, A, R, V, K и Q;

X100 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, S и N;

X100a представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, T, P, V, R, N и K;

X100b представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей V, S, T, L, Y, A, H, G и I;

X100c представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей Y, W и S;

X100d представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей R, V, L, Y, A, W, K, G, Q и I;

X100e представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей T, L, A и S;

X100f представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей T, L, G, P, N, A, Q, F, I и D;

б) вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) антитела человека или вариабельный домен легкой цепи гуманизированного антитела. В дополнительном варианте реализации антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с IL-17A человека, содержит производное вариабельного домена тяжелой цепи ( $V_{\text{H}}$ ), который содержит

а) три гипервариабельных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

HCDR1 включает последовательность G-T-F-A-T-S-P-M-G (SEQ ID NO: 4);

HCDR2, включает последовательность A-I-S-P-S-G-G-D-R-I-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID NO: 5);

HCDR3 включает последовательность C-A-V-R-R-R-F-D-G-T-S-Y-Y-T-G-D-Y-D-S (SEQ ID NO: 6);

б) вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) антитела человека или вариабельный домен легкой цепи гуманизированного антитела.

В еще одном варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, содержит производное вариабельного домена тяжелой цепи ( $V_{\text{H}}$ ), который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) антитела человека или вариабельный домен легкой цепи гуманизированного антитела.

В дополнительном варианте реализации изобретения антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, или его фрагмент, содержит производное  $V_{\text{H}}$ , где указанный вариабельный домен включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7.

В другом дополнительном варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, содержит производное вариабельного домена тяжелой цепи ( $V_{\text{H}}$ ), который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) антитела человека, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В еще одном дополнительном варианте реализации антитело, которое специфически связывающееся с IL-17A человека, или его фрагмент, содержит производное переменного домена тяжелой цепи ( $V_{\text{H}}$ ) и переменный домен легкой цепи ( $V_{\text{L}}$ ) антитела человека, где указанные переменные домены включают аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8.

В другом варианте реализации антитело, специфически связывается с IL-17A человека, содержит тяжелую цепь, которая содержит который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменный домен легкой цепи ( $V_{\text{L}}$ ) антитела человека, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В еще одном варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где указанные цепи включают аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичные SEQ ID NO: 9 и/или SEQ ID NO: 10.

В другом варианте реализации антитело согласно изобретению, которое специфически связывается с IL-17A человека, имеет аффинность связывания с IL-17A человека с  $K_{\text{D}}$  не более  $10^{-10}$  М. В еще одном варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, имеет кинетическую константу ассоциации  $\text{kon}(1/\text{Ms})$  для IL-17A человека не менее  $10^5$  1/Мс. В еще одном варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, имеет кинетическую константу диссоциации  $\text{dis}(1/\text{c})$  для IL-17A человека не более  $10^{-5}$  1/с. В дополнительном варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, способно ингибировать не менее чем на 50% активность IL-17A человека по любому из параметров, оцениваемых в любых тестах на специфическую активность.

В другом варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, продуцируют в клетках млекопитающих, дрожжевых или бактериальных клетках.

В еще одном варианте реализации антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, дополнительно содержит одну и более аминокислотных замен в Fc-регионе в сравнении с природным вариантом Fc, где указанные замены улучшают физико-химические и фармакокинетические свойства антитела по отношению к антителу с природным Fc-фрагментом и не приводят к потере способности антитела связывать IL-17A.

В другом аспекте изобретения предложена конструкция ДНК, кодирующая антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека. Кроме того, предложен экспрессионный вектор, содержащий одну или несколько конструкций ДНК, кодирующих антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека. Дополнительно, предложена клетка-хозяин, содержащая вектор для получения антитела, которое специфически связывается с IL-17A человека.

В дополнение, согласно изобретению предложен способ получения антитела, которое специфически связывается с IL-17A человека, заключающийся в культивировании клетки-хозяина, содержащей конструкцию ДНК, в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его активного фрагмента.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями. При этом в качестве дополнительных активных веществ фармацевтическая композиция может содержать дополнительные действующие вещества, выбранные из блокаторов ФНО- $\alpha$ . Данная композиция может быть использована для лечения опосредуемого IL-17A заболевания или нарушения. Опосредуемое IL-17A заболевание или нарушение выбрано из ревматоидного артрита, остеоартрита, ювенильного хронического артрита, септического артрита, артрита Лайма, псориазического артрита, реактивного артрита, спондилоартропатии, системной красной волчанки, болезни Крона, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, инсулинзависимого сахарного диабета, тиреоидита, астмы, аллергических заболеваний, псориаза, дерматита, склеродермии, реакции "трансплантат против хозяина", отторжения трансплантата органа, острого или хронического иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, саркоидоза, атеросклероза, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, болезни Кавасаки, болезни Грэйвса, нефротического синдрома, синдрома хронической усталости, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна-Геноха, микроскопического васкулита почек, хронического активного гепатита, увеита, септического шока, синдрома токсического шока, септического синдрома, кахексии, инфекционных заболеваний, паразитарных заболеваний, синдрома приобретенного иммунодефицита, острого поперечного миелита, хореи Гентингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, инсульта, первичного билиарного цирроза, гемолитической анемии, злокачественных опухолей, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, болезни Аддисона, спорадического полигландулярного дефицита типа I и полигландулярного дефицита типа II, синдрома Шмидта, взрослого (острого) респираторного дистресс-синдрома, алопеции, очаговой алопеции, серонегативной артропатии, артропатии, болезни Рейтера, псориазической артропатии, связанной с язвенным колитом артропатии, энтеропатического синовита, связанной с хламидиями, иерсиниями и сальмонеллами артропатии, спондилоартропатии, атероматозного заболевания/артериосклероза, атопической аллергии, аутоиммунного буллезного заболевания, пемфигуса обыкновенного, листовидного пемфигуса, пемфи-

гоида, болезни линейных IgA, аутоиммунной гемолитической анемии, Кумбс-положительной гемолитической анемии, приобретенной пернициозной анемии, ювенильной пернициозной анемии, миалгического энцефалита/ синдрома хронической усталости, хронического кожно-слизистого кандидоза, гигантоклеточного артериита, первичного склерозирующего гепатита, криптогенного аутоиммунного гепатита, синдрома приобретенного иммунодефицита, связанных с приобретенным иммунодефицитом заболеваний, гепатита В, гепатита С, переменного неклассифицируемого иммунодефицита (переменной неклассифицируемой гипогаммаглобулинемии), кардиомиопатии с дилатацией, женского бесплодия, недостаточности яичников, преждевременного угасания функции яичников, фиброзного заболевания легких, криптогенного фиброзного альвеолита, поствоспалительного интерстициального заболевания легких, интерстициального пневмонита, связанного с болезнью соединительной ткани интерстициального заболевания легких, связанного со смешанной болезнью соединительной ткани заболевания легких, связанного с системной склеродермией заболевания легких, связанного с ревматоидным артритом интерстициального заболевания легких, связанного с системной красной волчанкой заболевания легких, связанного с дерматомиозитом/полимиозитом заболевания легких, связанного с болезнью Шегрена, заболевания легких, связанного с анкилозирующим спондилитом заболевания легких, васкулитного диффузного заболевания легких, связанного с гемосидерозом заболевания легких, индуцированного лекарственным средством интерстициального заболевания легких, фиброза, связанного с радиацией фиброза, облитерирующего бронхиолита, хронической эозинофильной пневмонии, заболевания легких с инфильтрацией лимфоцитов, постинфекционного интерстициального заболевания легких, подагрического артрита, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного гепатита I типа (классического аутоиммунного или люпоидного гепатита), аутоиммунного гепатита II типа (гепатита, связанного с антителом против LKM), опосредуемой аутоиммунным заболеванием гипогликемии, устойчивости к инсулину типа В с акантокератодермией, гипопаратиреоза, острого иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, хронического иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, остеоартроза, первичного склерозирующего холангита, псориаза I типа, псориаза II типа, идиопатической лейкопении, аутоиммунной нейтропении, NOS-болезни почек, гломерулонефрита, микроскопического васкулита почек, болезни Лайма, дискоидной красной волчанки, идиопатического или NOS-мужского бесплодия, аутоиммунитета к сперматозоидам, рассеянного склероза (все подтипы), симпатической офтальмии, легочной гипертензии, вторичной для болезни соединительной ткани, синдрома Гудпасчера, легочного проявления узелкового полиартериита, острой ревматической атаки, ревматоидного спондилита, болезни Стилла, системной склеродермии, синдрома Шенгрена, болезни/артериита Такаясу, аутоиммунной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопении, аутоиммунного заболевания щитовидной железы, гипертиреозидизма, зобного аутоиммунного гипотиреоза (болезнь Хашимото), атрофического аутоиммунного гипотиреоза, первичной микседемы, факогенного увеита, первичного васкулита, витилиго, острого заболевания печени, хронического заболевания печени, алкогольного цирроза, индуцированного алкоголем повреждения печени, холестаза, идиосинкразического заболевания печени, индуцированного лекарственным средством гепатита, неалкогольного стеатогепатита, аллергии и астмы, стрептококковой инфекции группы В (GBS), психических расстройств (включая депрессию и шизофрению), опосредуемых типом Th2 и типом Th1 заболеваний, острой и хронической боли (различные формы боли), и злокачественных опухолей, таких как рак легкого, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, толстого кишечника, поджелудочной железы, яичника, предстательной железы и прямой кишки и гемопоэтические злокачественные опухоли (лейкоз и лимфома), абеталипопротеинемии, акроцианоза, острых и хронических паразитарных и инфекционных процессов, острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острой или хронической бактериальной инфекции, острого панкреатита, острой почечной недостаточности, аденокарцином, эктопической систолы предсердий, СПИД-дементного комплекса, индуцированного алкоголем гепатита, аллергического конъюнктивита, аллергического контактного дерматита, аллергического ринита, отторжения аллотрансплантата, дефицита альфа-1-антитрипсина, бокового амиотрофического склероза, анемии, стенокардии, дегенерации клеток передних рогов спинного мозга, терапию против CD3, антифосфолипидного синдрома, реакций гиперчувствительности против рецепторов, аортальных и периферических аневризм, расслоения аорты, артериальной гипертензии, артериосклероза, артериовенозного свища, атаксии, фибрилляции предсердий (постоянной или пароксизмальной), трепетания предсердий, атриовентрикулярной блокады, В-клеточной лимфомы, отторжения трансплантата кости, отторжения трансплантата костного мозга (ВМТ), блокады пучка Гиса, лимфомы Беркитта, ожогов, аритмий сердца, синдрома оглушения сердца, опухолей сердца, кардиомиопатии, воспалительных ответов на искусственное кровообращение, отторжения трансплантата хряща, дегенерации коры головного мозга, нарушений мозжечка, хаотической или многоочаговой тахикардии предсердий, связанных с химиотерапией нарушений, хронического миелоцитарного лейкоза (СМЛ), хронического алкоголизма, хронических воспалительных патологий, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического obstructивного заболевания легких (ХОЗЛ), хронической интоксикации салицилатами, карциномы ободочной и прямой кишки, застойной сердечной недостаточности, конъюнктивита, контактного дерматита, легочного сердца, болезни коронарных артерий, болезни Крейтцфельда-Якоба, культурально-негативного сепсиса, кистозного фиброза, связанных с цитокиновой терапией нарушений, деменции бок-

серов, демиелинизирующих заболеваний, геморрагической лихорадки денге, дерматита, дерматологических состояний, диабета, сахарного диабета, диабетического атеросклеротического заболевания, диффузного заболевания с тельцами Леви, застойной кардиомиопатии с дилатацией, нарушений базальных ганглиев, синдрома Дауна в среднем возрасте, двигательных нарушений, индуцированных лекарственным средством, которое блокирует дофаминовые рецепторы ЦНС, чувствительности к лекарственным средствам, экземы, энцефаломиелита, эндокардита, эндокринопатии, эпилепсии, инфекции вирусом Эпштейна-Барр, эритроцитопении, экстрапирамидальных и мозжечковых нарушений, семейного гематофагоцитарного лимфогистиоцитоза, отторжения имплантата эмбрионального тимуса, наследственной атаксии Фридрейха, функциональных нарушений периферических артерий, грибкового сепсиса, газовой гангрены, язвы желудка, гломерулонефрита, отторжения трансплантата любого органа или ткани, грамотрицательного сепсиса, грамположительного сепсиса, гранулем вследствие внутриклеточных организмов, волосатоклеточного лейкоза, болезни Галлервордена-Шпатца, тиреоидита Хашимото, сенной лихорадки, отторжения трансплантата сердца, гемахроматоза, гемодиализа, гемолитического уремического синдрома/тромбоцитопенической тромбоцитопенической пурпуры, кровопотери, гепатита (А), аритмий пучка Гиса, ВИЧ-инфекции/ВИЧ-невропатии, болезни Ходжкина, гиперкинетических двигательных нарушений, реакций гиперчувствительности, связанного с гиперчувствительностью пневмонита, гипертензии, гипокинетических двигательных нарушений, обследования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, идиопатической болезни Аддисона, идиопатического фиброза легких, опосредуемой антителами цитотоксичности, астении, младенческой спинальной мышечной атрофии, воспаления аорты, вируса гриппа А, облучения ионизирующей радиацией, иридоциклита/увеита/оптического неврита, повреждения при ишемии-реперфузии, ишемического инсульта, ювенильного ревматоидного артрита, ювенильной спинальной мышечной атрофии, саркомы Капоши, отторжения трансплантата почки, легионеллеза, лейшманиоза, лепры, повреждений кортикоспинальной системы, жирового отека, отторжения трансплантата печени, лимфатического отека, малярии, злокачественной лимфомы, злокачественного гистиоцитоза, злокачественной меланомы, менингита, менингококкемии, метаболических/идиопатических заболеваний, мигрени, митохондриального полисистемного нарушения, смешанной болезни соединительной ткани, моноклональной гаммапатии, множественной миеломы, полисистемной дегенерации (Менцеля, Дежерина-Тома, Шая-Дрейджера и Мачадо-Джозефа), миастении, внутриклеточных *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, миелодиспластического синдрома, инфаркта миокарда, ишемических нарушений миокарда, карциномы носоглотки, хронического заболевания легких новорожденных, нефрита, нефроза, нейродегенеративных заболеваний, нейрогенных мышечных атрофии I, нейтропенической лихорадки, неходжкинских лимфом, окклюзии брюшного отдела аорты и ее ветвей, окклюзионных нарушений артерий, терапии ОКТЗ®, орхита/эпидидимита, орхита/возвратных процедур после вазэктомии, органомегалии, остеопороза, отторжения трансплантата поджелудочной железы, карциномы поджелудочной железы, паранеопластического синдрома/гиперкальцемии при злокачественной опухоли, отторжения трансплантата паращитовидной железы, воспалительного заболевания органов таза, круглогодичного ринита, заболевания перикарда, периферического артериосклеротического заболевания, периферических сосудистых нарушений, перитонита, пернициозной анемии, пневмонии *Pneumocystis carinii*, пневмонии, синдрома POEMS (полиневропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия и синдром кожных изменений), постперфузионного синдрома, синдрома после искусственного кровообращения, посткардиотомного синдрома после инфаркта миокарда, преэклампсии, прогрессирующего супрануклеарного паралича, первичной гипертензии легких, лучевой терапии, феномена и болезни Рейно, болезни Рейно, болезни Рефсума, регулярной тахикардии с узким комплексом QRS, вазоренальной гипертензии, реперфузионного повреждения, рестриктивной кардиомиопатии, сарком, склеродермии, сенильной хореи, сенильной деменции с тельцами Леви, серонегативных артропатий, шока, серповидноклеточной анемии, отторжения аллотрансплантата кожи, синдрома кожных изменений, отторжения трансплантата тонкого кишечника, солидных опухолей, специфических аритмий, спинальной атаксии, спиноомозжечковых дегенерации, стрептококкового миозита, структурных повреждений мозжечка, подострого склерозирующего панэнцефалита, обмороков, сифилиса сердечно-сосудистой системы, системной анафилаксии, синдрома системного воспалительного ответа, ювенильного ревматоидного артрита с системным началом, Т-клеточного или FAB ALL, телеангиэктазии, облитерирующего тромбангита, тромбоцитопении, токсичности, трансплантации, травмы/кровопотери, реакций гиперчувствительности типа III, гиперчувствительности типа IV, нестабильной стенокардии, уремии, уросепсиса, крапивницы, заболеваний клапанов сердца, варикоза вен, васкулита, заболеваний вен, венозного тромбоза, фибрилляции желудочков, вирусных и грибковых инфекций, энцефалита с высоким риском смертельного исхода/асептического менингита, гемофагоцитарного синдрома с высоким риском смертельного исхода, синдрома Вернике-Корсакова, болезни Вилсона, отторжения ксенотрансплантата любого органа или ткани, острого коронарного синдрома, острого идиопатического полиневрита, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии, острой ишемии, болезни Стилла взрослых, очаговой алопеции, анафилаксии, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, артериосклероза, атопической экземы, атопического дерматита, аутоиммунного дерматита, аутоиммунного нарушения, связанного со стрептококковой инфекцией, аутоиммунной энтеропатии, аутоиммунной

потери слуха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного миокардита, аутоиммунного преждевременного угасания функции яичников, блефарита, бронхоэктазов, буллезного пемфигоида, сердечно-сосудистого заболевания, катастрофического антифосфолипидного синдрома, глютеиновой болезни, шейного спондилеза, хронической ишемии, рубцового пемфигоида, клинически изолированного синдрома (cis) с риском рассеянного склероза, конъюнктивита, психиатрического нарушения с началом в детском возрасте, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), дакриоцистита, дерматомиозита, диабетической ретинопатии, сахарного диабета, грыжи межпозвоночного диска, пролапса межпозвоночного диска, индуцированной лекарственным средством иммунной гемолитической анемии, эндокардита, эндометриоза, эндофтальмита, эписклерита, полиформной эритемы, тяжелой полиформной эритемы, гестационного пемфигоида, синдрома Гийена-Барре, сенной лихорадки, синдрома Хьюза, идиопатической болезни Паркинсона, идиопатической интерстициальной пневмонии, опосредуемой IgE аллергии, иммунной гемолитической анемии, миозита с тельцами включения, инфекционного воспалительного заболевания глаз, воспалительного демиелинизирующего заболевания, воспалительного заболевания сердца, воспалительного заболевания почек, идиопатического пневмосклероза/ идиопатического легочного фиброза, ирита, кератита, сухого кератоконъюнктивита, болезни Куссмауля или болезни Куссмауля-Мейера, паралича Ландри, гистиоцитоза клеток Лангерганса, синдрома мраморной кожи, дегенерации желтого пятна, микроскопического полиангиита, болезни Бехтерева, нарушений двигательных нейронов, пемфигоида слизистых оболочек, полиорганной недостаточности, миастении, миелодиспластического синдрома, миокардита, нарушений корешков нервов, невропатии, не-А не-В гепатита, оптического неврита, остеолитизиса, рака яичника, олигоартикулярного ювенильного ревматоидного артрита, окклюзионного заболевания периферических артерий, заболевания периферических сосудов, заболевания периферических артерий (PAD), флебита, узелкового полиартериита (или нодозного полиартериита), полихондрита, ревматической полимиалгии, полиоза, полиартикулярного ювенильного ревматоидного артрита, синдрома полиэндокринной недостаточности, полимиозита, ревматической полимиалгии (PMR), синдрома после искусственного кровообращения, первичного паркинсонизма, рака предстательной железы и прямой кишки и гемопоэтических злокачественных опухолей (лейкоз и лимфому), простатита, истинной эритроцитарной аплазии, первичной недостаточности надпочечников, рецидивирующего оптического нейромиелинита, рестеноза, ревматической болезни сердца, SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остеоит), склеродермии, вторичного амилоидоза, шокового легкого, склерита, ишиаса, вторичной недостаточности надпочечников, связанного с кремний органическими соединениями заболевания соединительных тканей, дерматоза Снеддона-Уилкинсона, анкилозирующего спондилита, синдрома Стивенса-Джонсона, синдрома системного воспалительного ответа, височного артериита, токсоплазменного ретинита, токсического эпидермального некролиза, поперечного миелита, TRAPS (связанный с рецептором фактора некроза опухоли периодический синдром), аллергической реакции I типа, диабета типа II, крапивницы, обычной интерстициальной пневмонии (UIP), васкулита, весеннего конъюнктивита, вирусного ретинита, синдрома Фогта-Коянаги-Харада (синдром VKN), влажной дегенерации желтого пятна, заживления ран и связанной с иерсиниями и сальмонеллами артропатии. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, которое специфически связывается с IL-17A человека, может вводиться в терапевтически эффективном количестве для лечения опосредованного IL-17A заболевания или нарушения.

Также предложен способ лечения опосредованного IL-17A заболевания или нарушения с помощью антитела, которое специфически связывается с IL-17A человека. Способ лечения может дополнительно включать введение блокаторов ФНО- $\alpha$ .

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение, но не предназначены для ограничения настоящего изобретения в какой-либо мере.

В описание включены все источники информации посредством ссылок.

### Примеры

Пример 1.

Схема получения антитела на основе V<sub>HH</sub>.

На фиг. 1 представлена принципиальная схема создания и оптимизации антитела на основе V<sub>HH</sub>.

Пример 2.

Продукция рекомбинантных антигенов и антител в суспензионной культуре клеток млекопитающих.

Антитела и антигены продуцировали в клетках постоянной клеточной линии, полученной из клеток яичника китайского хомячка (линия CHO-K1), согласно опубликованным протоколам [26; 27]. Использовали клетки, конститутивно экспрессирующие ген белка EBNA1 (Epstein-Barrvirus nuclear antigen 1). Суспензионное культивирование осуществляли в колбах на орбитальном шейкере, с использованием бессывороточных сред производства компании Life Technologies Corporation, согласно инструкциям производителя. Для транзientной экспрессии клетки в концентрации  $2 \times 10^6$ /мл трансфецировали с помощью линейного полиэтиленimina (ПЭИ "MAX", компания "Polysciences"). Соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:3-1:10. Через 5-7 дней после трансфекции культуральную среду центрифугировали при 2000g в те-

чение 20 мин и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии.

Рекомбинантный белок IL-17A, содержащий шесть аминокислот His на С-конце белка, выделяли и очищали из культуральной жидкости, используя смолу Profinity IMAC Ni-charged (компании Bio-Rad). До очистки в культуральную жидкость добавляли NiCb до концентрации 1 мМ. Далее добавляли в культуральную жидкость 5 мл смолы Profinity IMAC Ni-charged и перемешивали на качалке 1 ч при комнатной температуре. Переносили сорбент на колонку Thermo scientific Polypropylene columns объемом 5 мл, промывали 5 колоночными объемами ФСБ, чтобы вымыть неспецифически связывающие компоненты. Связанный антиген элюировали, используя 0,3 М имидазол, pH 8, 150 мМ NaCl. Далее белок переводили в ФСБ (pH 7,4) с помощью диализа, используя технологию SnakeSkin Dialysis Tubing, фильтровали (0,22 мкм), переносили в пробирки и хранили при -70°C. Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза (фиг. 2-4).

Исследуемые и контрольное антитела IgG1 очищали на колонке HiTrap ProteinAFF объемом 1 мл (GE Healthcare) согласно методике, описанной выше для антигена IL-17A-Fc. Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза (фиг. 2-4).

Пример 3.

Иммунизация ламы IL-17A человека и создание Fab библиотеки фаговых антител ламы.

Животное Lama Glama последовательно иммунизировали 5 раз путем подкожного введения антигенного материала, смешанного с равным объемом полного (при первой инъекции) или неполного (при остальных инъекциях) адъюванта Фрейнда. В качестве антигена использовали смесь рекомбинантных белков (по 0,2 мг каждого из белков на 1 инъекцию), одним из которых был человеческий IL-17A (набор от R&D Systems). Вторую инъекцию (стадию иммунизации) проводили через 3 недели после первой, затем с интервалом в две недели проводили еще три иммунизации. Взятие крови (50 мл) проводили через 5 дней после каждой инъекции, начиная с третьей.

Отобранную кровь ламы после иммунизации разводили в 2 раза раствором ФСБ, содержащим 1 мМ ЭДТА. 35 мл разбавленного раствора крови наслаивали на среду Histopaque®-1077 (от Sigma) с плотностью 1,077 г/мл объемом 15 мл и проводили центрифугирование в течение 20 мин при 800g. Мононуклеарные клетки (лимфоциты и моноциты) отбирали из интерфазной зоны плазма/среда Histopaque, после чего промывали раствором ФСБ, содержащим 1 мМ ЭДТА.

Суммарную РНК мононуклеарных клеток ламы выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit согласно предлагаемому протоколу (QIAGEN). Концентрацию РНК определяли с помощью Nanovue (GE Healthcare) и проверяли качество выделенной РНК с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора MMLV RT kit (от Evrogen) согласно рекомендуемому протоколу с использованием обратной транскриптазы MMuLV и рандом-гексамерных олигонуклеотидов в качестве затравки.

Продукты обратной транскрипции использовали в качестве матрицы в двухступенчатой полимеразной цепной реакции для получения генов варибельных доменов, фланкированных сайтами рестрикции, с использованием набора олигонуклеотидов и протоколам авторов [27-29]. Далее, соединение генов варибельных доменов легких и тяжелых цепей в один фрагмент проводили путем последовательных реакций рестрикции, лигирования и амплификации согласно схеме, приведенной на фиг. 5. Гены тяжелых цепей соединяли с генами каппа и отдельно с генами лямбда легких цепей. При этом расчетное количество молекул матрицы во всех реакциях составляло не менее  $10^{11}$ . Полученный ДНК препарат V<sub>L</sub>-C<sub>K</sub>-V<sub>H</sub> обрабатывали рестриктазами NheI /Eco91I и лигировали в оригинальную фагмиду pH 5. Строеие полученной фагмиды показано на фиг. 6. Продукты лигирования трансформировали в электрокомпетентные клетки штамма SS320, полученные согласно протоколам [30]. Репертуар производной каппа Fab библиотеки составил  $5,1 \times 10^8$  и лямбда Fab библиотеки -  $3,7 \times 10^8$  соответственно. Препарат фага наивных библиотек был приготовлен согласно процедуре, описанной ранее [31].

Пример 4.

Селекция Fab-библиотек фаговых антител.

Специфичные анти-IL-17A фаговые Fab-антитела выделяли из фаговой Fab-дисплейной библиотеки на рекомбинантном IL-17A человека (R&D Systems), осуществляя серии циклов селекции, как описано ранее [27; 31; 32]. Для осуществления селекции методом пэннинга IL-17A человека в 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,5) адсорбировали в течение ночи при 4°C на поверхности сорбирующих пробирок HighSorb (Nunc). Пробирки промывали ФСБ (pH 7,4), затем блокировали раствором ФСБ (pH 7,4) - обезжиренное молоко (0,5% мас./об.) в течение 1 ч. Далее, 2-4 мл раствора фагов в ФСБ (pH 7,4) - обезжиренное молоко (0,5% мас./об.) в концентрации 10 фаговых частиц на 1 мл добавляли в пробирку с антигеном и инкубировали в течение 1 ч при перемешивании. Несвязавшиеся фаги удаляли в ходе серий циклов промывки с использованием раствора ФСБ (pH 7,4) - Твин 20 (0,1% об./об.). Количество отмывок увеличивали от первого раунда к третьему раунду 20-30-40 раз соответственно. Оставшиеся связанными фаговые частицы элюировали 100 мМ раствором Gly-HCl (pH 2,5) в течение 15 мин при перемешивании, затем нейтрализовали 1 М TRIS-HCl (pH 7.6). Бактерии штамма E.coli TG1 инфицировали полученными фагами, за-

тем фаги выделяли и использовали в следующем цикле селекции.

После второго и третьего раундов селекции на IL-17A, проведенный ИФА анализ препарата поликлонального фага показал значительное обогащение. Полученный пул клонов, обогащенных Fab человека, специфичных против IL-17A, был реклонирован в экспрессионную плазмиду pLL, содержащую мустак и His6 tag на C-конце гена CN1 тяжелой цепи.

Пример 5.

Анализ специфического связывания Fab с IL-17A человека.

ИФА (ELISA) использовали для измерения связывания исследуемых Fab-фрагментов с IL-17A человека. В качестве позитивного контроля использовали Fab антитела AIN457 с опубликованной последовательностью (от Novartis). Для анализа специфического связывания лунки планшетов ELISA (от Nunc ImmunoMaxisorp) покрывали 50 мкл (0,5 мкг/мл в 1X покрывающем карбонатном буфере) IL-17A, герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартному ИФА протоколу с использованием высокопроизводительной автоматизированной платформы на базе роботизированных систем GenetixQ-pix2xt (от Molecular Device) и Tecan Freedom EVO 200 (от Tecan). Для блокирования неспецифического связывания добавляли блокирующий буфер BV (200 мкл 0,5% нежирного молока в ФСБ). Планшеты инкубировали на шейкере в течение часа при комнатной температуре. После отмывок ФСБ-Твином добавляли по 50 мкл на лунку тестируемого клеточного супернатанта, содержащего исследуемый Fab, смешанного с равным объемом блокирующего буфера. Планшеты снова инкубировали, встряхивая, 1 ч при комнатной температуре, после чего каждую лунку планшетов пять раз промывали буфером ФСБ-Твин. После промывания добавляли (50 мкл/лунку) античеловеческого Fab HRP-конъюгированного вторичного антитела (от Pierce-ThermoScientific) в соотношении 1:5000 в ФСБ-Твин. Планшеты встряхивали на ротационном шейкере (50 мин, комнатная температура) и промывали пять раз буфером ФСБ-Твин, как описано выше. Колориметрический сигнал развивали добавлением ТМВ (100 мкл/лунку) до насыщения (в среднем 3-5 мин), затем дальнейшее развитие останавливали добавлением стопового раствора (100 мкл/лунку, 10% серная кислота). Цветовой сигнал измеряли при длине волны 450 нм, используя подходящий планшет-ридер Tecan-Sunrise (от Tecan). Степень связывания антитела была пропорциональна продуцированию цветового сигнала. Клоны, у которых цветовой сигнал превышал фоновый более чем в 5 раз, были проверены в конкурентном ИФА анализе для выявления антагонистических Fab, блокирующих взаимодействие IL-17A лиганда и рецептора.

Пример 6.

Конкурентный ИФА анализ блокирования взаимодействия IL17A лиганда и IL17R рецептора.

Конкурентный ИФА для проверки антагонистической способности отобранных ранее специфичных Fab против IL-17A человека. В качестве позитивного контроля антагониста использовали Fab антитела AIN457с опубликованной последовательностью (от Novartis). Рецептор IL-17RA-Fc (от R&D Systems) иммобилизовали в лунки планшетов ELISA (от Nunc Immuno Maxisorp) по 50 мкл с концентрацией 1 мкг/мл в 1X покрывающем карбонатном буфере и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартным ИФА протоколам с использованием высокопроизводительной автоматизированной платформы на базе роботизированных систем GenetixQ-pix2xt (от Molecular Device) и Tecan Freedom EVO 200 (от Tecan). Для блокирования неспецифического связывания добавляли блокирующий буфер BV (200 мкл 0,5% нежирного молока в ФСБ). Планшеты инкубировали на шейкере в течение часа при комнатной температуре.

Параллельно 50 мкл тестируемого клеточного супернатанта, содержащего исследуемый Fab, смешивали в несвязывающем 96-луночном планшете с 50 мкл IL-17A-His6-Flag с концентрацией 0,4 мкг/мл в 1% молоке на ФСБ-Твин. Инкубировали 1 ч при 37°C и перемешивании на шейкере при 500 об/мин.

После отмывок от блокирующего буфера в планшет, содержащий IL-17RA-Fc рецептор, переносили описанную выше реакционную смесь Fab и IL-17A-His6-Flag лиганда в расчете 90 мкл на лунку. Планшеты снова инкубировали, встряхивая, 45 мин при комнатной температуре, после чего каждую лунку планшетов пять раз промывали буфером ФСБ-Твин. Добавляли 50 мкл/лунку анти-FLAG мышинового M2 антитела (от Sigma) при концентрации 1 мкг/мл. Инкубировали 45 мин при комнатной температуре, после чего каждую лунку планшетов 5 раз промывали буфером ФСБ-Твин. Добавляли 50 мкл/лунку антимышинового-IgG HRP-конъюгированного вторичного антитела (от Pierce-ThermoScientific) в разведении 1:5000 в ФСБ-Твин. Планшеты встряхивали на ротационном шейкере 45 мин при комнатной температуре и промывали 5 раз буфером ФСБ-Твин, как описано выше. Колориметрический сигнал развивали добавлением ТМВ (100 мкл/лунку) до насыщения (в среднем 3-5 мин), затем дальнейшее развитие останавливали добавлением стопового раствора (100 мкл/лунку, 10% серная кислота). Цветовой сигнал измеряли при длине волны 450 нм, используя подходящий планшет-ридер Tecan-Sunrise (от Tecan). Степень связывания антитела была пропорциональна продуцированию цветового сигнала.

Клоны, показавшие блокирование на уровне контрольного Fab антитела AIN457, были отмечены как позитивные и использовались в дальнейших анализах. Гены варибельных доменов позитивных клонов были секвенированы, согласно стандартным протоколам на аппарате Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) и проанализированы. Клоны, содержащие в составе 3V<sub>HH</sub>Fab варибельный

домен, были взяты в дальнейшие исследования (фиг. 7). Также обнаружили, что клон 3V<sub>HNFab</sub> представлен в комбинации с 23 различными по последовательности доменами легких цепей, из которых три приведены фиг. 7, что может свидетельствовать об его относительной структурной толерантности и о том, что именно V<sub>HNFab</sub> домен, а не легкая цепь вносит вклад во взаимодействие с IL-17A.

Пример 7.

Сравнительный скрининг анти-IL-17A V<sub>HNFab</sub> кандидатов по кинетической константе диссоциации  $k_{off}$  ( $k_{dis}$ ).

Сравнительный скрининг  $k_{off}$  для анти-IL-17A Fab кандидатов проводили с использованием прибора Pall Forte Bio Octet Red 96. Анти FАВСН1 биосенсоры в течение 30 мин регидратировались в рабочем буфере, содержащем 10 мМ ФСБ, рН 7,2-7,4, 0,1% Твин-20, 0,1% БСА. В исследуемые образцы супернатантов E.coli добавляли 10X-рабочий буфер до конечной концентрации 1x. Затем анти FАВСН1 биосенсоры погружали в супернатанты E.coli, содержащие Fab-фрагменты кандидатов антител, на 12 ч при 4°C. Сенсоры с иммобилизованными на поверхности Fab-фрагментами переносили в лунки с рабочим буфером, где прописывалась базовая линия (60 с). Далее сенсоры переносили в лунки с раствором анализата (IL-17A, 30 мкг/мл) для ассоциации комплекса антиген-антитело (300 с). Затем сенсоры возвращали в лунки, содержащие рабочий буфер, для последующей стадии диссоциации (300 с). После каждого эксперимента использованные сенсоры регенерировали путем трехкратного помещения их в буфер для регенерации (Gly-HCl, рН 1,7) после чего они могли быть использованы в следующем эксперименте. Анализ полученных кривых проводили с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis (версия 7.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1.

Результаты  $k_{off}$ -скрининга анти-IL-17A Fab кандидатов представлены на Fig. 8 и табл.1. Продемонстрировано специфическое высокоаффинное связывание всех уникальных V<sub>HNFab</sub> с IL-17A человека, при этом 3V<sub>HNFab</sub> демонстрировали очень быструю  $k_{on}$  и очень медленную  $k_{dis}$ (1/с), выходящую за пределы чувствительности прибора.

Таблица 1

Аффинность V<sub>HNFab</sub> к IL-17A человека

	$K_D$ (M)	$k_{on}$ (1/Me)	$k_{dis}$ (1/с)
1V <sub>HNFab</sub>	2.485E-08	2.498E04	6.206E-04
2V <sub>HNFab</sub>	1.352E-08	1.628E05	2.201E-03
3V <sub>HNFab</sub> VK4B11	-	-	<2.272E-06

Таким образом, на основании данных анализов кандидат 3V<sub>HNFab</sub>VK4B11 был отобран для дальнейшего исследования.

Пример 8.

Создание V<sub>HNFab</sub>IgG1 антител, с мутациями в участке FR1 и FR2 варибельного домена V<sub>HNFab</sub>.

Гены варибельного домена легкой и тяжелой V<sub>HNFab</sub> цепей кандидата 3V<sub>HNFab</sub>VK4B11 были клонированы в плазмиды pEE-Hc и pEB-Lc для совместной транзientной экспрессии в клетках CHO-EBNA, как описано в Примере 3. Далее, методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза вводили замены в позиции 44 и 45 (по номенклатуре Kabat) с помощью PfuUltraHS polymerase (Stratagene) согласно протоколу [Q5α Site-Directed Mutagenesis Kit (от NEB)] и методике [34], используя в качестве матрицы плазмиду pEE-3V<sub>HNFab</sub>. Продукты ПЦР фракционировали на легкоплавкой агарозе и очищали на колонках. После реакции лигирования ДНК трансформировали в E.coli. После отбора корректных по последовательности мутантных клонов, плазмиды с мутациями в 3V<sub>HNFab</sub> котрансфецировали с pEE-LcVK4B11 (см. фиг. 9, табл. 2).

Таблица 2

Образцы мутантных клонов 3V<sub>HNFab</sub>VK4B11

Название	Мутации относительно исходного 3V <sub>HNFab</sub> VK4B11
mut1	E44G, R45L
mut2	S11L, E44G, R45L
mut3	R45L
mut4	S11L, E44G

Пример 9.

Сравнительный анализ кинетических характеристик V<sub>HNFab</sub> антител, с мутациями в участке FR1 и FR2 варибельного домена V<sub>HNFab</sub>.

Сравнительный скрининг  $k_{off}$  для анти-IL-17A V<sub>HNFab</sub> кандидатов скрининг производился с использованием прибора Pall Forte Bio Octet Red 96 по стандартному протоколу (см. Пример 8). В результате было обнаружено заметное снижение величин  $k_{off}$  для mut1, mut2 и mut4 и менее значительное снижение для mut3 в сравнении с диким 3V<sub>HNFab</sub> (см. фиг. 10, 11).

Пример 10.

Сравнительный анализ термоагрегационных характеристик 3V<sub>HH</sub>IgG1VK4B11 полноразмерных антител, с мутациями в участке FR1 и FR2 варибельного домена V<sub>HH</sub>.

Сравнительный анализ агрегационных характеристик для анти-IL-17A V<sub>HH</sub>IgG1 кандидатов проводили по следующей методике. Препарат антитела V<sub>HH</sub>IgG1 с концентрацией около 10 мг/мл в ФСБ буфере прогревали в течение 6 ч при температуре 50°C. Определение агрегации после термостресса проводили методом гель-фильтрационной высокоэффективной хроматографии. Хроматографию проводили на системе ВЭЖХ (Agilent) 1100 на колонке Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, 7,8 мм × 30 см, кат. № 08541 с предколонкой Tosoh TSKgel Guard SWXL, 6,0 мм × 4,0 см, с диаметром частиц 7 мкм, кат. № 08543. Элюирование проводили в изократическом режиме подвижной фазой: 50 mM Na, 0,3 M NaCl, pH 7,0 на скорости потока 0,5 мл/мин. Детектирование проводили на длинах волн 214 и 280 нм. Образцы антител разводили буфером ФСБ, pH 7,5, до концентрации ~1 мг/мл. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл. Предварительно была хроматографирована калибровочная смесь Gel filtration standard (от Bio-Rad), кат. № 151-1901.

Представленные на фиг. 12, 13 хроматограммы и сводная табл. 3 демонстрируют, что все мутанты в различной степени агрегируют в условиях термостресса, причем минимально стабилен дикий вариант, а максимальной стабильностью обладаем mut1 с заменами E44G+R45L, характерными для классической структуры V<sub>H</sub>.

Кроме того, для изучения сравнительной термостабильности полученных препаратов также применили методику Thermofluor (также известную как Thermal shift assay), которая отражает температуру плавления белка, фиксируя изменение флюоресценции специального красителя SYPROOrange с гидрофобными участками денатурированного белка [35]. Используя прибор StepOneReal-TimePCRSytem (Applied Biosystems) и рекомендуемый протокол, было проведено исследование препаратов мутантов. Полученные результаты исследований приведены в табл. 3. Они в значительной степени коррелируют с результатами термостресс-теста, подтверждая повышенную стабильность mut1 и mut4 в сравнении с исходным вариантом 3V<sub>HH</sub>IgG1VK4B11.

Таблица 3

Результаты исследований мутантов на термостабильность

Препарат	Процент мономеров термостресса	% до	Процент% мономеров после термостресса	Разница до и после термостресса ~Δ%	Темп.Плавления (Thermofluor), °C
Wild 3V <sub>HH</sub> IgG1VK4B11	60		13	47	46 ± 1
mut1	95		95	0	64 ± 1
mut2	65		13	52	42 ± 1
mut3	40		32	8	ND
mut4	89		80	9	53 ± 1

Пример 11.

Клеточный тест блокирования мутантов анти-IL17A 3V<sub>HH</sub>IgG1VK4B11 функции IL-17A индуцировать продукцию IL-6.

Способность IL-17 индуцировать производство IL-6 человеческими клетками линии HT1080 (ATCC:CCL-121) использовали для анализа нейтрализующей активности V<sub>HH</sub>IgG1 кандидатов mut1 и mut4 в отношении человеческого рекомбинантного IL-17. Клетки выращивали в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% инактивированной эмбриональной сыворотки, гентамицином и глутамином. Клетки в количестве 5×10<sup>4</sup> на лунку высевали в 96-луночные плоскостонные планшеты для культуры клеток. Клетки оставляли в течение 5 ч для прикрепления. Смесь рекомбинантного 40 нг/мл IL-17 и 20 нг/мл ФНО-α инкубировали с разведениями антитела V<sub>HH</sub>IgG1 в течение 1 ч при 37°C. Затем смесь цитокина и антитела добавляли к клеткам и оставляли на ночь. Производство IL-6 в культуре клеток HT1080 было пропорционально добавленному количеству IL-17. Количество высвобожденного IL-6 в клеточных супернатантах определяли методом ELISAc помощью системы "DuoSet ELISA development system human IL6" (от RD System, Cat. № DY206). Результаты анализа антагонистических свойств кандидатов V<sub>HH</sub>IgG1 приведены на Fig. 14 в сравнении с антителом AIN457 (анти-IL-17A антитело от Novartis). mut1 показал величину IC<sub>50</sub>, что было почти в 30 раз выше, чем в исходном варианте, тогда как вариант mut4 сохранил практически полностью свои ингибирующие свойства. Величина IC<sub>50</sub> для mut4 кандидата составила 30±10 пМ. По результатам этого исследования данный кандидат по совокупности физико-химических и биологических характеристик был выбран для дальнейшей работы по оптимизации свойств.

Пример 12.

Конструирование mut4 V<sub>HH</sub>Fab антител, содержащих легкие цепи человека.

Суммарную РНК В-лимфоцитов из крови 550 человеческих доноров выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit согласно предлагаемому протоколу (от QIAGEN). Концентрацию РНК определяли с помощью набора Nanovue (от GE Healthcare) и проверяли качество выделенной РНК с помощью электро-

фореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора MMLV RT kit (от Evrogen) согласно рекомендуемому протоколу с использованием обратной транскриптазы MMLV и рандом-гексамерных олигонуклеотидов в качестве затравки.

Продукты обратной транскрипции использовали в качестве матрицы в двухступенчатой полимеразной цепной реакции для получения генов переменных доменов, фланкированных сайтами рестрикции, с использованием набора олигонуклеотидов и протоколам авторов [27]. Создание химерных Fab, специфичных против IL-17A, проводили согласно технологии, описанной в WO93/06213, на основе оригинальной фагмиды pH5, описанной выше. Для этого, соединение генов переменных доменов легких цепей человека с геном переменного домена mut4 V<sub>HH</sub> в один фрагмент проводили путем последовательных реакций рестрикции, лигирования и амплификации, согласно схеме, приведенной на фиг. 15, 16. При этом расчетное количество молекул матрицы генов переменных доменов человека во всех реакциях составляло не менее 10<sup>12</sup>. Полученный ДНК препарат V<sub>L</sub>-СК-V<sub>H</sub> обрабатывали рестриктазами NheI/Eco91I и лигировали в оригинальную фагмиду pH5. Продукты лигирования трансформировали в электрокомпетентные клетки штамма SS320, полученные согласно протоколам [30]. Репертуар химерной mut4 V<sub>HH</sub> Fab-библиотеки на основе смешанных каппа и лямбда цепей человека составил 2,8×10<sup>9</sup> трансформантов. Препараты фага химерных Fab-библиотек были приготовлены согласно процедуре, описанной ранее [27].

Селекции полученных фаговых химерных Fab-библиотек проводили в условиях аналогичных, описанным выше (см. Пример 5), за исключением дополнительной инкубации связанных с IL-17A фаговых антител в присутствии 20 мкг/мл растворенного IL17A при 37 С в течение 12 ч.

После второго раунда селекции на IL-17A было замечено значительное обогащение библиотеки. Полученные в результате этого пулы клонов обогащенных химерных mut4 V<sub>HH</sub> Fab-библиотек были использованы в скрининге на IL-17A согласно стандартному протоколу (см. Пример 6). Результирующие позитивные клоны были секвенированы. На фиг. 16 приведены четыре последовательности переменных доменов легких цепей VK1A7, VK3c18, VK3c118 и VK4c1E12 человека из высокоаффинных mut4 V<sub>HH</sub>Fab. Последовательности принадлежат к различным каппа VK1, VK3 и VK4 гермлайн человека с минимальным количеством соматических мутаций. Следует добавить, что последовательность VK4c1E12 человека в значительной степени гомологична ранее отобранной легкой цепи VK4B11 ламы с характеристическими отличиями.

Пример 13.

Сравнительный анализ термоагрегационных характеристик mut4V<sub>HH</sub>IgG1 полноразмерных антител, с различными вариантами легких цепей.

Гены переменного домена тяжелых V<sub>HH</sub> цепей кандидата mut4 V<sub>HH</sub> были клонированы в плазмиды pEE-Hc, а гены переменных доменов легких цепей VK1A7, VK3c18, VK3c118, VK3A4, VK4E12 человека домена легкой цепи - в pEE-Lc для совместной транзиторной экспрессии в клетках CHO-EBNA, как описано в Примере 3. Далее, полученные антитела подвергали термострессу и анализировали агрегационный профиль согласно Примеру 9. Результаты приведены в сводной табл. 4.

Таблица 4

Термоагрегационные характеристики mut4 V<sub>HH</sub>IgG1 полноразмерных антител

Название пробы	Структурное семейство легкой цепи	Мономер % до термостресса	Мономер % после термостресса	Разница до и после термостресса ~Δ%	Образование видимых агрегатов при очистке	Темп. Плавления (ThermoFluor)
mut4VHHIgG1VK3c8	VK3	96	82	14	+	58С
mut4VHHIgG1VK3c18	VK3	91	81	10	++	61С
mut4VHHIgG1VK3A4	VK3	71	69	2	+	61С
mut4VHHIgG1VK1A7	VK1	95	88	7	-	63С
mut4VHHIgG1VK4E12	VK4	90	49	41	++	59С

Кроме того, для изучения сравнительной термостабильности полученных препаратов применили методику ThermoFluor, аналогично описанной в Примере 11. На основании полученных данных можно сделать вывод, что были отобраны более стабильные пары mut4 V<sub>HH</sub>с легкими цепями человека, чем исходный вариант с легкой цепью ламы VK4B11. Таким образом, лучшие характеристики сравнительной агрегационной стабильности продемонстрировали комбинации mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK1A7 и mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK3c18.

Пример 14.

Клеточный тест блокирования функции IL-17A индуцировать продукцию IL-6 с помощью mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK3c8 и mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK1A7.

Способность IL-17 индуцировать производство IL-6 человеческими клетками линии HT1080 (ATCC:CCL-121) использовали для анализа нейтрализующей активности V<sub>HH</sub>IgG1 кандидатов mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK3c8 и mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK1A7 в отношении человеческого рекомбинантного IL-17A, как показано в Примере 12. На фиг. 17 приведены результаты такого исследования на блокирование. Следует отметить, что у варианта mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK1A7, отличающегося максимальной стабильностью, наблюдали значительное падение величины IC50, тогда как вариант mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK3c8, отличающийся средней стабильностью, почти в несколько раз превысил величину ингибирования более стабильного варианта mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK1A7.

Пример 15.

Создание mut4 V<sub>HH</sub>IgG1 полноразмерных антител с различными мутациями в позициях 44 и 45 FR2 варибельного домена V<sub>HH</sub> и сравнительный анализ их агрегационных и функциональных характеристик.

С целью дальнейшего повышения агрегационной стабильности методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза были проведены замены в позициях 44 и 45 FR2 региона V<sub>HH</sub> для кандидата mut4 V<sub>HH</sub>IgG1VK3c8 (для упрощения здесь и далее - m4V<sub>HH</sub>c8). В исследование не были включены варианты с ароматическими, алифатическими и позитивными аминокислотами в позиции 44 как потенциально иммуногенные и структурно запрещенные. Мутанты были транзитивно наработаны, как описано в Примере 3 (фиг. 15, 16). Хотя количество препарата для различных мутантов варьировало от одного эксперимента к другому, следует отметить, что выходы внутри одного эксперимента для различных замен являлись соразмерными. Полученные варианты мутантов подвергали термострессу. В табл. 5 приведены результаты термостресс-теста для различных мутантов. Как видно по результатам, наименее стабильными мутантами являются 44G45G и 44G45D, которые имеют сниженную стабильность по сравнению с исходной комбинацией 44G45R в составе m4V<sub>HH</sub>c8. Такие варианты, как 44G45N, 44V45T, 44D45T, 44T45T, 44D45V, сохранили в значительной степени свою стабильность. В случае комбинаций остальных мутаций наблюдали добавочный эффект в увеличении агрегационной стабильности m4V<sub>HH</sub>c8, причем наиболее стабильными оказались варианты с ароматическими и алифатическими группами в позиции 45. Однако варианты с малыми гидрофильными и гидрофобными аминокислотами в обеих позициях, такие как 44G45V, 44G45T, 44V45V, 44A45V, 44T45V, 44A45T, 44S45T, также продемонстрировали значительную стабильность.

Таблица 5

Результаты транзитивной продукции и термостресса мутантов в позициях 44 и 45 FR2 региона m4V<sub>HH</sub>c8

№	Название мутанта по позиции 44+45 FR2 m4V <sub>HH</sub> c8		Процент мономера исх.% *	Процент мономера прогрет%*	~Δ%	Продукционный выход препарата ** (номер эксперимента) ≈, mg/L	IC50, пмоль*** в сравнительном клеточном IL6 тесте
1	44G	45R	96	81	15	41 (1)	50
2	44G	45F	98	98	0	22 (3)	1100
3	44G	45W	97	97	0	57 (2)	1200
4	44G	45Y	97	97	0	33 (2)	650
5	44G	45P	98	98	0	41 (1)	800
6	44G	45I	97	97	0	20 (3)	950
7	44G	45L	97	97	0	25 (3)	1000
8	44G	45G	96	50	46	21 (3)	ND

9	44G	45N	90	77	13	26 (2)	ND
10	44G	45S	93	85	8	45 (2)	100
11	44G	45D	90	40	50	23 (3)	ND
12	44G	45A	93	89	4	27 (3)	100
13	44G	45H	93	93	2	25 (3)	150
14	44G	45V	93	93	0	35 (1)	250
15	44G	45Q	91	84	7	36 (1)	ND
16	44G	45T	93	93	0	46 (1)	100
17	44V	45T	95	84	11	64 (4)	ND
18	44D	45T	95	83	12	72 (4)	ND
19	44T	45T	96	86	10	75 (4)	150
20	44A	45T	95	93	2	74 (4)	150
21	44S	45T	96	94	2	63 (4)	150
22	44V	45V	95	95	0	71 (4)	150
23	44D	45V	96	88	12	28 (4)	150
24	44A	45V	95	95	0	72 (4)	100
25	44T	45V	96	95	1	73 (4)	150
26	AIN457		95	95	0	0	1100

\* Погрешность в различных сериях составляет до 5%.

\*\* Сильно варьирует в зависимости от эксперимента, более корректное сравнение делается для препаратов из одной серии.

\*\*\* Для различных серий погрешность составляет до 50%.

С целью проверки нейтрализующей активности в клеточном тесте аналогично Примеру 12 были проведены эксперименты с различными вариантами мутаций (фиг. 20). Результаты приведены в табл. 5. Как показано, аминокислоты с малыми размерами в позициях 44 и 45 FR2 региона  $V_{HH}$  в значительной степени демонстрировали высокие антагонистические свойства, тогда как большие аминокислоты (ароматические и алифатические) при заменах в позиции 45 приводили к 10-кратному снижению величины  $IC_{50}$ . Таким образом, на фиг. 21 показана диаграмма стабильности и функциональных свойств для мутантов, содержащих различные аминокислотные замены в регионе, определяющие взаимодействие вариабельного домена тяжелой и легкой цепей.

Пример 16.

Сканирующий мутагенез позиций в CDRs antiIL17A  $3V_{HH}$  домене.

Для введения мутаций в индивидуальные позиции CDR-участков кандидата была использована методика NNK кодоновой рандомизации [26] с помощью Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (от NEB) согласно протоколу, в качестве матрицы используя плазмиду pLL-Fab. Продукты ПЦР фракционировали на легкоплавкой агарозе и очищали на колонках. После реакции лигирования ДНК трансформировали в *E. coli* экспрессирующий штамм BL21gold (от Stratagene). Полученные индивидуальные клоны наращивали в условиях Fab-экспрессии в 96-луночных планшетах, как описано ранее. Супернатанты, содержащие мутантные Fab, анализировали с использованием методов ИФА, описанных ранее, с использованием высокопроизводительной автоматизированной платформы на базе роботизированных систем Genetix Q-rix2xt и Tecan Freedom EVO200. Концентрация иммобилизованного IL-17A составляла 0,2 мкг/мл. Окрашивание связанных Fab проводили с разведенным 1:5000 конъюгатом Goat anti-Human IgG (Fab')<sub>2</sub> (HRP) (от Pierce) и краской ТМБ+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с последующим измерением оптической плотности при длине волны 450 нм.

Результаты сканирующего мутагенеза представлены в табл.6. В таблице приведены замены в позициях CDR регионов, которые соответствуют не более чем на 30% уменьшению сигнала связывания мутантных Fabс IL-17A человека в сравнении с "дикой" последовательностью. Таким образом, эти индивидуальные мутанты или любые их комбинации также являются объектом изобретения согласно данному изобретению.

Таблица 6

Результаты сканирующего мутагенеза

Позиция мутации	Состав положительных ак мутантов
<b>HCDR3</b>	
V94	S, T, A, K, D, G
R95	K
R96	Y, H, W, K, D, G
R97	A, L, M, S, H, V
F98	-
D99	E, G, A, R, V, K, Q
G100	N, S
T100a	G, P, V, R, S, N, K
S100b	V, M, T, L, T, A, H, G, I, C
Y100c	W, S
Y100d	R, L, W, K, A, G, Q, I, V
T100e	A, L, S
G100f	A, L, T, P, N, Q, F, I, D
D107	-
<b>HCDR2</b>	
A50	G, L
S52	-
P52a	A
S53	-
G54	-
G55	S, R, P, D, I, T, E, K, A, L
D56	-
R57	-
I58	-
<b>HCDR1</b>	
S32	N, K, R, E, W, M, Q, D, F, V, L, A
P33	S
M34	I
G35	L, A, I, S, R, V, N, Q, M

Таким образом, проведен скрининг аминокислотных позиций CDR регионов антитела BCD 109, толерантных к заменам на другие аминокислоты. В результате этого обнаружено, что данный набор аминокислотных замен значительно не меняют аффинности антитела к IL-17A человека. Комбинация замен в таких позициях может быть использована для оптимизации различных свойств кандидата.

Пример 17.

Создание BCD109 кандидата и определение аффинности к IL-17A из различных видов организмов.

Антитело BCD19 было получено из варианта m4V<sub>HH</sub>с8, содержащего замены 44G45T, описанного в Примере 16, путем внесения гуманизирующих мутаций Q5V, R89V в V<sub>HH</sub>, не изменяющих свойств стабильности или IC<sub>50</sub> (данные не приведены) и трех добавочных мутаций в CH2 домене FcIgG1, 232Y/234T/236E, для улучшения фармакокинетики антитела. Антитело было транзистентно наработано.

Анализ аффинности связывания BCD 109 к IL-17A человека, макаки и крысы производился на приборе OctetRed 96 (от ForteBio). BCD 109 было неспецифически иммобилизовано на поверхность аминокислотных сенсоров второго поколения (от AR2G) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя, для подготовки и иммобилизации AR2G сенсоров. Анализ был произведен при 30°C с использованием ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера.

Титрование IL-17A человека, макаки и крысы производили с использованием рабочего буфера от концентрации 126 до 2 нМ с шагом 2.

Кривые связывания с вычетом референсного сигнала анализировали с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis (версия 7.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1. Результаты приведены на фиг. 22.

Как видно, BCD 109 связывается с рекомбинантным препаратом IL-17A человека и IL-17A макаки с пикомолярной аффинностью (фиг. 23). Кроме того, полученный кандидат антитела BCD 109 не взаимодействует с IL-17A крысы (данные не приведены).

Пример 18.

Определение агрегационной стабильности BCD109 в условиях термостресса.

Препарат антитела BCD 109 с концентрацией около 10 мг/мл в ФСБ буфере прогревали в течение 6 ч при температуре 50°C, по протоколу, описанному в Примере 9.

Представленные на фиг. 24 результаты показывают, что антитело BCD 109 стабильно в условиях термостресса, при этом образование агрегатов составило менее 5%.

Пример 19.

Получение фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно изобретению.

Антитело BCD 109 в концентрации 50 мг/мл растворяли в необходимом количестве воды для инъекций, доводили pH до 5,5 с помощью лимонной кислоты, фильтровали полученный раствор (стерилизующая фильтрация) и запаивали в ампулы.

Полученный препарат был стабилен в течение 6 месяцев, без образования осадка.

Также антитело BCD 109 растворяли в воде, содержащей маннитол в качестве лиопротектора, фильтровали (стерилизующая фильтрация) и подвергали лиофилизации. Полученный порошок упаковывали в стерильные флаконы. Флаконы закупоривали резиновыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками. Полученный препарат антитела можно восстановить из лиофилизата при применении воды для инъекций.

#### Ссылки

1. Porter R.R. 1973. Structural studies of immunoglobulins. *Science*. **180**, 713–716.
2. Padlan E.A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol.Immunol.* **31**, 169–217.
3. Dwek R.A., Sutton B.J., Perkins S.J., Rademacher T.W.1984. Structure–function relationships in immunoglobulins. *Biochem. Soc. Symp.* **49**, 123–136.
4. Burton D.R. 1985. Immunoglobulin G: functional sites. *Mol. Immunol.* **22**, 161–206.
5. Hamers Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Bajyana Songa E., Bendahman N., Hamers R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*.**363**, 446–448.
- 6.С. В. Тиллиб “Верблюжья наноантитела” – эффективный инструмент для исследований, диагностики и терапии. *Молекулярная биология, 2011, том 45, № 1, с. 77–85*
7. Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., Muyldermans S.1999. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy–chain antibodies. *Mol. Immunol.* **36**, 515–524.
8. Woolven B.P., Frenken L., van der Logt P., Nicholls P.J. 1999. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy–chain antibody formation. *Immunogenetics*.**50**, 98–101.
9. Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., Muyldermans S.2000. Camel heavy–chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen–binding repertoire. *EMBO J.* **19**, 921–931.
10. De Genst E., Saerens D., Muyldermans S., Conrath K. 2006. Antibody repertoire development in camelids. *Develop. Comp. Immunol.* **30**, 187–198.
11. Muyldermans S., Cambillau C., Wyns L. 2001. Recognition of antigens by single–domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *TIBS*. **26**, 230–235.

12. De Genst E., Silence K., Decanniere K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S. 2006. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 4586–4591.
13. Kabat E., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C. 1991. Sequence of proteins of immunological interest. *US Public Health Services*. NIH, Bethesda, MD, Publication no. 91–3242.
14. Nguyen V.K., Desmyter A., Muyldermans S. 2001. Functional heavy-chain antibodies in camelidae. *Adv. Immunol.* **79**, 261–296.
15. Muyldermans S., Baral T.N., Retamozzo V.C., et al. 2009. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **128** (1–3), 178–183.
16. de Genst E., Silence K., Decanniere K., Loris R., Kinne J., Wyns L., Muyldermans S. 2005. Strong *in vivo* maturation compensates for structurally restricted H3 loops in antibody repertoires. *J. Biol. Chem.* **280**, 14114–14121.
17. Lauwereys M., Ghahroudi M., Desmyter A., Kinne J., Holzer W., De Genst E., Wyns L., Muyldermans S. 1998. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy chain antibodies. *EMBO J.* **17**, 3512–3520.
18. Kontermann RE. 2009 Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs*.; 23(2):93-109.
19. Ken Coppieters, Torsten Dreier, Karen Silence, Hans de Haard, Marc Lauwereys, Peter Casteels, Els Beirnaert, Heidi Jonckheere, 2006 Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis *Arthritis & Rheumatology* .; 54(6):1856-66.
20. Gabrielle Richard, Ashley J Meyers, Michael D McLean, Mehdi Arbabi-Ghahroudi, Roger MacKenzie, J Christopher Hall 2013. *In Vivo* Neutralization of  $\alpha$ -Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (V<sub>H</sub>Hs) and a V<sub>H</sub>H-Fc Antibody. *PLoS One* 22;8(7):e69495.
21. Jan Terje Andersen, Maria Gonzalez-Pajuelo, Stian Foss, Ole J. B. Landsverk, Débora Pinto, Alexander Szyroki, Hans J. de Haard, Michael Saunders, Peter

Vanlandschoot Inger Sandlie 2012, Selection of Nanobodies that Target Human Neonatal Fc Receptor. *Scientific Reports*, 3, 1118.

22. Vincke C<sup>1</sup>, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. 2009 General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*. Jan 30; 284(5): 3273-84..

23. Barthelemy PA, Raab H, Appleton BA, Bond CJ, Wu P, Wiesmann C, Sidhu SS. 2008 Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains. *J Biol Chem*. Feb 8;283(6):3639-54.

24. Conrath K, Vincke C, Stijlemans B, Schymkowitz J, Decanniere K, Wyns L, Muyldermans S, Loris R. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J Mol Biol*. 2005 Jul 1; 350 (1): 112-25.

25. Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W (2004) Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res* 21:897-903

26. Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations. Volume 6. Sterile products / Sarfaraz K. Niazi, 2004.

27. J. de Haard H., van Neer N., Anneke Reurs, E. Hufton S., Roovers R., Henderikx P., de Bruïne A., Arends J.-W. and Hoogenboom H. A Large Non-immunized Human Fab Fragment Phage Library That Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies. *J Biol Chem*. 1999 Jun 25 274(26):18218-30.

28. WO 2010/001251.

29. Koch-Nolte F., Reyelt J., Schöbow B., Schwarz N., Scheuplein F., Rothenburg S., Haag F., Alzogaray V., Cauerhff A. and Goldbaum F. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *FASEB J.*, 2007 Nov; 21(13):3490-8.

30. Sidhu S., Lowman H., Cunningham B., Wells J. Phage display for selection of novel binding peptides. *J. Methods Enzymol*. 2000; 328: 333-63.

31. Marks J., Hoogenboom H., Bonnert T., McCafferty J., Griffiths A., Winter G. By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 1991 Dec 5; 222(3):581-97.
32. Vaughan T., Williams A., Pritchard K., Osbourn J., Pope A., Earnshaw J., McCafferty J., Hodits R., Wilton J. and Johnson K. Human Antibodies with Subnanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library. *Nat Biotechnol.* 1996 Mar; 14 (3): 309-14.
34. *Environ Microbiol.* 2006 Feb;72(2):1141-7;  
M.Abs. 2012 May-Jun; 4(3): 341-8.
35. Cummings M., Farnum M., and Nelen M. Universal Screening Methods and Applications of ThermoFluor® . *J Biomol Screen* 2006 11(7): 854-863.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное моноклональное антитело типа IgG, которое специфически связывается с IL-17A человека, содержащее:

а) производное варибельного домена тяжелой цепи  $V_{\text{H}}$  антител животных семейства Camelidae, который содержит три гиперварибельных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где:

HCDR1 включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1:

G-T-F-A-T-X32-X33-X34-X35,

где X32 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей S, N, K, R, E, W, M, Q, D, F, V, L и A;

X33 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей P или S;

X34 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей M и I;

X35 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, L, A, I, S, R, V, N, Q и M;

HCDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2:

X50-I-X52-X52a-S-G-X55-D-R-I-Y-A-D-S-V-K-G,

где X50 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей A, G и L;

X52 представляет собой аминокислоту S;

X52a представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей P и A;

X55 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, S, R, P, D, I, T, E, K, A и L;

HCDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3:

C-A-X94-X95-X96-X97-F-X99-X100-X100a-X100b-X100c-X100d-X100e-X100f-D-Y-D-S,

где X94 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей V, S, T, A, K, D и G;

X95 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей R и K;

X96 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей R, Y, H, W, K, D и G;

X97 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей R, A, L, M, S, H и V;

X99 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей D, E, G, A, R, V, K и Q;

X100 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, N и S;

X100a представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей T, G, P, V, R, S, N и K;

X100b представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей S, V, M, T, L, A, H, G, I и C;

X100c представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей Y, W и S;

X100d представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей Y, R, L, W, K, A, G, Q, I и V;

X100e представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей T, A, L и S;

X100f представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей G, A, L, T, P, N, Q, F, I и D;

б) варибельный домен легкой цепи  $V_{\text{L}}$  антитела или варибельный домен легкой цепи гуманизованного антитела.

2. Антитело по п.1, отличающееся повышенной агрегационной стабильностью производного  $V_{\text{H}}$  в сравнении с исходным антителом  $V_{\text{H}}$ , выделенным из иммунизированного животного семейства

Camelidae.

3. Антитело по п.1, в котором производное  $V_{HH}$  содержит следующие аминокислотные замены в позициях  $44X_245X_3$ :

a) где  $44X_2 = G, A, V, S, T$ ;

b) где  $45X_3 = A, V, T, H$ ;

или их комбинации.

4. Антитело по п.3, отличающееся повышенной агрегационной стабильностью производного  $V_{HH}$  в сравнении с исходным антителом  $V_{HH}$ , выделенным из иммунизированного животного семейства Camelidae.

5. Антитело по п.1, отличающееся тем, что производное  $V_{HH}$  представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи антитела, выделенный из иммунизированного животного семейства Camelidae и имеющий дополнительные аминокислотные замены, характерные для человека в любых позициях, исключая следующие указанные аминокислотные замены в позициях  $44X_245X_3$ :

c) где  $44X_2 = G, A, V, S, T$ ;

d) где  $45X_3 = A, V, T, H$ ;

или их комбинации.

6. Антитело по п.1, отличающееся тем, что производное  $V_{HH}$  представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, выделенный из неиммунизированного животного группы Camelidae и имеющий дополнительные аминокислотные замены, характерные для человека в любых позициях, исключая указанные аминокислотные замены в позициях  $44X_245X_3$ :

e) где  $44X_2 = G, A, V, S, T$ ;

f) где  $45X_3 = A, V, T, H$ ;

или их комбинации.

7. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен легкой цепи  $V_L$  является вариабельным доменом легкой цепи ( $V_L$ ) человека.

8. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен легкой цепи  $V_L$  является гуманизированным фрагментом антитела животного, предпочтительно млекопитающего.

9. Антитело по п.1, отличающееся тем, что производное  $V_{HH}$  содержит цистеин в позиции 44 согласно номенклатуре Kabat, а вариабельный домен легкой цепи  $V_L$  содержит цистеин в позиции 100 согласно номенклатуре Kabat.

10. Антитело по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело является антителом любого из изо-типов IgG1 IgG2, IgG3 или IgG4.

11. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и хранении при  $T=4^\circ\text{C}$  в течение более чем 6 месяцев содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе.

12. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до  $37^\circ\text{C}$  в течение более чем 2 недель содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе.

13. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до  $42^\circ\text{C}$  в течение более чем 48 ч содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе.

14. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и повышении температуры до  $50^\circ\text{C}$  в течение более чем 6 ч содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе.

15. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет константу диссоциации с  $K_D$  не более  $10^{-9}$  М.

16. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет кинетическую константу ассоциации с антигеном  $k_{on}(1/Ms)$  не менее  $10^5$  1/Мс.

17. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет кинетическую константу диссоциации с антигеном  $dis(1/c)$  не более  $10^{-4}$  1/с.

18. Антитело по пп.1-17, где

HCDR1 включает последовательность G-T-F-A-T-S-P-M-G (SEQ ID NO: 4);

HCDR2 включает последовательность A-I-S-P-S-G-G-D-R-I-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID NO: 5);

HCDR3 включает последовательность C-A-V-R-R-R-F-D-G-T-S-Y-Y-T-G-D-Y-D-S (SEQ ID NO: 6).

19. Антитело по п.1, специфически связывающееся с IL-17A человека, где указанный вариабельный домен тяжелой цепи  $V_{HH}$  включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7.

20. Антитело по п.19, специфически связывающееся с IL-17A человека, где указанный вариабельный домен тяжелой цепи  $V_{HH}$  включает аминокислотную последовательность

QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGTETFAAISPSGGDR

IYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTAVYYCAVRRRFDGTSYYTGDYDSWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7).

21. Антитело по п.1, специфически связывающееся с IL-17A человека, где варибельный домен легкой цепи  $V_L$  антитела включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8.

22. Антитело по п.21, специфически связывающееся с IL-17A человека, где варибельный домен легкой цепи  $V_L$  антитела включает аминокислотную последовательность

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPD

RFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYSYSPVTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 8).

23. Антитело по п.1, специфически связывающееся с IL-17A человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где указанные цепи соответственно включают аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 10.

24. Антитело по п.23, специфически связывающееся с IL-17A человека и содержащее:

a) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGTFFVAAISPS

GGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTAVYYCAVRRRFDGTSYYTGDY

DSWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT

HTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAG

QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9).

b) легкую цепь  $V_L$  антитела человека, которая включает аминокислотную последовательность

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRA

TGIPDRFSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYSYSPVTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF

IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL

SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

25. Антитело по п.1, способное ингибировать не менее чем на 50% активность IL-17A человека.

26. Антитело по п.1, отличающееся тем, что его продуцируют в клетках млекопитающих, дрожжевых или бактериальных клетках.

27. Антитело по п.1, отличающееся тем, что дополнительно содержит одну и более аминокислотных замен в Fc-регионе в сравнении с природным вариантом Fc, где указанные замены выбирают из группы: 232Y, 234T, 236E или любую их комбинацию.

28. Фрагмент антитела по пп.1-27, который специфически связывается с IL-17A человека, где указанный фрагмент выбран из группы, включающей  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ , Fab', Fab, Fv и scFv.

29. Фрагмент антитела по п.28, который представляет собой Fab-фрагмент.

30. Фрагмент антитела по п.28, который представляет scFv-фрагмент.

31. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-27 или его фрагмент по любому из пп.28-30.

32. Нуклеиновая кислота по п.31, где нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

33. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по пп.31, 32.

34. Клеточная линия для продуцирования антитела по любому из пп.1-27 или его фрагмента по любому из пп.28-30, содержащая вектор по п.33 или нуклеиновую кислоту по пп.31, 32.

35. Способ получения антитела по любому из пп.1-27 или фрагмента антитела по пп.28-30, включающий культивирование клеточной линии по п.34 в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его активного фрагмента.

36. Клетка-хозяин для продуцирования антитела по любому из пп.1-27 или его фрагмента по любому из пп.28-30, содержащая вектор по п.33 или нуклеиновую кислоту по пп.31, 32.

37. Способ получения антитела по любому из пп.1-27 или фрагмента антитела по пп.28-30, включающий культивирование клетки-хозяина по п.34 в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его активного фрагмента.

38. Фармацевтическая композиция для лечения опосредуемого IL-17A заболевания или нарушения, содержащая антитело по любому из пп.1-27 или его фрагмент по пп.28-30, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

39. Фармацевтическая композиция по п.38, содержащая дополнительные действующие вещества, выбранные из блокаторов ФНО- $\alpha$ .

40. Фармацевтическая композиция по п.38, где опосредуемое IL-17A заболевание или нарушение

выбрано из ревматоидного артрита, остеоартрита, ювенильного хронического артрита, септического артрита, артрита Лайма, псориазического артрита, реактивного артрита, спондилоартропатии, системной красной волчанки, болезни Крона, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, инсулин-зависимого сахарного диабета, тиреоидита, астмы, аллергических заболеваний, псориаза, дерматита, склеродермии, реакции "трансплантат против хозяина", отторжения трансплантата органа, острого или хронического иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, саркоидоза, атеросклероза, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, болезни Кавасаки, болезни Грэйвса, нефротического синдрома, синдрома хронической усталости, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна-Геноха, микроскопического васкулита почек, хронического активного гепатита, увеита, септического шока, синдрома токсического шока, септического синдрома, кахексии, инфекционных заболеваний, паразитарных заболеваний, синдрома приобретенного иммунодефицита, острого поперечного миелита, хореи Гентингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, инсульта, первичного билиарного цирроза, гемолитической анемии, злокачественных опухолей, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, болезни Аддисона, спорадического полигландулярного дефицита типа I и полигландулярного дефицита типа II, синдрома Шмидта, взрослого (острого) респираторного дистресс-синдрома, алопеции, очаговой алопеции, серонегативной артропатии, артропатии, болезни Рейтера, псориазической артропатии, связанной с язвенным колитом артропатии, энтеропатического синовита, связанной с хламидиями, иерсиниями и сальмонеллами артропатии, спондилоартропатии, атероматозного заболевания/артериосклероза, атопической аллергии, аутоиммунного буллезного заболевания, пемфигуса обыкновенного, листовидного пемфигуса, пемфигоида, болезни линейных IgA, аутоиммунной гемолитической анемии, Кумбс-положительной гемолитической анемии, приобретенной пернициозной анемии, ювенильной пернициозной анемии, миалгического энцефалита/ синдрома хронической усталости, хронического кожно-слизистого кандидоза, гигантоклеточного артериита, первичного склерозирующего гепатита, криптогенного аутоиммунного гепатита, синдрома приобретенного иммунодефицита, связанных с приобретенным иммунодефицитом заболеваний, гепатита В, гепатита С, варибельного неклассифицируемого иммунодефицита (варибельной неклассифицируемой гипогаммаглобулинемии), кардиомиопатии с дилатацией, женского бесплодия, недостаточности яичников, преждевременного угасания функции яичников, фиброзного заболевания легких, криптогенного фиброзного альвеолита, поствоспалительного интерстициального заболевания легких, интерстициального пневмонита, связанного с болезнью соединительной ткани интерстициального заболевания легких, связанного со смешанной болезнью соединительной ткани заболевания легких, связанного с системной склеродермией заболевания легких, связанного с ревматоидным артритом интерстициального заболевания легких, связанного с системной красной волчанкой заболевания легких, связанного с дерматомиозитом/полимиозитом заболевания легких, связанного с болезнью Шегрена заболевания легких, связанного с анкилозирующим спондилитом заболевания легких, васкулитного диффузного заболевания легких, связанного с гемосидерозом заболевания легких, индуцированного лекарственным средством интерстициального заболевания легких, фиброза, связанного с радиацией фиброза, облитерирующего бронхолита, хронической эозинофильной пневмонии, заболевания легких с инфильтрацией лимфоцитов, постинфекционного интерстициального заболевания легких, подагрического артрита, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного гепатита I типа (классического аутоиммунного или лupoидного гепатита), аутоиммунного гепатита II типа (гепатита, связанного с антителом против LKM), опосредуемой аутоиммунным заболеванием гипогликемии, устойчивости к инсулину типа В с акантокератодермией, гипопаратиреоза, острого иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, хронического иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, остеоартроза, первичного склерозирующего холангита, псориаза I типа, псориаза II типа, идиопатической лейкопении, аутоиммунной нейтропении, NOS-болезни почек, гломерулонефрита, микроскопического васкулита почек, болезни Лайма, дискоидной красной волчанки, идиопатического или NOS-мужского бесплодия, аутоиммунитета к сперматозоидам, рассеянного склероза (все подтипы), симпатической офтальмии, легочной гипертензии, вторичной для болезни соединительной ткани, синдрома Гудпасчера, легочного проявления узелкового полиартериита, острой ревматической атаки, ревматоидного спондилита, болезни Стилла, системной склеродермии, синдрома Шенгрена, болезни/артериита Такааясу, аутоиммунной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопении, аутоиммунного заболевания щитовидной железы, гипертиреоза, зобного аутоиммунного гипотиреоза (болезнь Хашимото), атрофического аутоиммунного гипотиреоза, первичной микседемы, факогенного увеита, первичного васкулита, витилиго, острого заболевания печени, хронического заболевания печени, алкогольного цирроза, индуцированного алкоголем повреждения печени, холестаза, идиосинкразического заболевания печени, индуцированного лекарственным средством гепатита, неалкогольного стеатогепатита, аллергии и астмы, стрептококковой инфекции группы В (GBS), психических расстройств (включая депрессию и шизофрению), опосредуемых типом Th2 и типом Th1 заболеваний, острой и хронической боли (различные формы боли), злокачественных опухолей, таких как рак легкого, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, толстого кишечника, поджелудочной железы, яичника, предстательной железы и прямой кишки и гемопоэтические злокачественные опухоли (лейкоз и лимфома), абеталипопротеинемии, акроцианоза, острых и хронических паразитарных и инфекционных процессов, острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого

миелоидного лейкоза, острой или хронической бактериальной инфекции, острого панкреатита, острой почечной недостаточности, аденокарцином, эктопической систолы предсердий, СПИД-дементного комплекса, индуцированного алкоголем гепатита, аллергического конъюнктивита, аллергического контактного дерматита, аллергического ринита, отторжения аллотрансплантата, дефицита альфа-1-антитрипсина, бокового амиотрофического склероза, анемии, стенокардии, дегенерации клеток передних рогов спинного мозга, терапии против CD3, антифосфолипидного синдрома, реакций гиперчувствительности против рецепторов, аортальных и периферических аневризм, расслоения аорты, артериальной гипертензии, артериосклероза, артериовенозного свища, атаксии, фибрилляции предсердий (постоянной или пароксизмальной), трепетания предсердий, атриовентрикулярной блокады, В-клеточной лимфомы, отторжения трансплантата кости, отторжения трансплантата костного мозга (ВМТ), блокады пучка Гиса, лимфомы Беркитта, ожогов, аритмий сердца, синдрома оглушения сердца, опухолей сердца, кардиомиопатии, воспалительных ответов на искусственное кровообращение, отторжения трансплантата хряща, дегенерации коры головного мозга, нарушений мозжечка, хаотической или многоочаговой тахикардии предсердий, связанных с химиотерапией нарушений, хронического миелоцитарного лейкоза (СМЛ), хронического алкоголизма, хронических воспалительных патологий, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), хронической интоксикации салицилатами, карциномы ободочной и прямой кишки, застойной сердечной недостаточности, конъюнктивита, контактного дерматита, легочного сердца, болезни коронарных артерий, болезни Крейтцфельда-Якоба, культурально-негативного сепсиса, кистозного фиброза, связанных с цитокиновой терапией нарушений, деменции боксеров, демиелинизирующих заболеваний, геморрагической лихорадки денге, дерматита, дерматологических состояний, диабета, сахарного диабета, диабетического атеросклеротического заболевания, диффузного заболевания с тельцами Леви, застойной кардиомиопатии с дилатацией, нарушений базальных ганглиев, синдрома Дауна в среднем возрасте, двигательных нарушений, индуцированных лекарственным средством, которое блокирует дофаминовые рецепторы ЦНС, чувствительности к лекарственным средствам, экземы, энцефаломиелита, эндокардита, эндокринопатии, эпиглоттита, инфекции вирусом Эпштейна-Барр, эритроцелламии, экстрапирамидальных и мозжечковых нарушений, семейного гематофагоцитарного лимфогистиоцитоза, отторжения имплантата эмбрионального тимуса, наследственной атаксии Фридрейха, функциональных нарушений периферических артерий, грибкового сепсиса, газовой гангрены, язвы желудка, гломерулонефрита, отторжения трансплантата любого органа или ткани, грамотрицательного сепсиса, грамположительного сепсиса, гранулем вследствие внутриклеточных организмов, волосатоклеточного лейкоза, болезни Галлервордена-Шпатца, тиреоидита Хашимото, сенной лихорадки, отторжения трансплантата сердца, гемахроматоза, гемодиализа, гемолитического уремического синдрома/тромболитической тромбоцитопенической пурпуры, кровопотери, гепатита (А), аритмий пучка Гиса, ВИЧ-инфекции/ВИЧ-невропатии, болезни Ходжкина, гиперкинетических двигательных нарушений, реакций гиперчувствительности, связанного с гиперчувствительностью пневмонита, гипертензии, гипокинетических двигательных нарушений, обследования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, идиопатической болезни Аддисона, идиопатического фиброза легких, опосредуемой антителами цитотоксичности, астении, младенческой спинальной мышечной атрофии, воспаления аорты, вируса гриппа А, облучения ионизирующей радиацией, иридоциклита/увеита/оптического неврита, повреждения при ишемии-реперфузии, ишемического инсульта, ювенильного ревматоидного артрита, ювенильной спинальной мышечной атрофии, саркомы Капоши, отторжения трансплантата почки, легионеллеза, лейшманиоза, лепры, повреждений кортикоспинальной системы, жирового отека, отторжения трансплантата печени, лимфатического отека, малярии, злокачественной лимфомы, злокачественного гистиоцитоза, злокачественной меланомы, менингита, менингококкемии, метаболических/идиопатических заболеваний, мигрени, митохондриального полисистемного нарушения, смешанной болезни соединительной ткани, моноклональной гаммапатии, множественной миеломы, полисистемной дегенерации (Менцеля, Дежерина-Тома, Шая-Дрейджера и Мачадо-Джозефа), миастении, внутриклеточных *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, миелодиспластического синдрома, инфаркта миокарда, ишемических нарушений миокарда, карциномы носоглотки, хронического заболевания легких новорожденных, нефрита, нефроза, нейродегенеративных заболеваний, нейрогенных мышечных атрофии I, нейтропенической лихорадки, неходжкинских лимфом, окклюзии брюшного отдела аорты и ее ветвей, окклюзионных нарушений артерий, терапии ОКТ3®, орхита/эпидидимита, орхита/возвратных процедур после вазэктомии, органомегалии, остеопороза, отторжения трансплантата поджелудочной железы, карциномы поджелудочной железы, паранеопластического синдрома/гиперкальцемии при злокачественной опухоли, отторжения трансплантата паращитовидной железы, воспалительного заболевания органов таза, круглогодичного ринита, заболевания перикарда, периферического артериосклеротического заболевания, периферических сосудистых нарушений, перитонита, пернициозной анемии, пневмонии *Pneumocystis carinii*, пневмонии, синдрома ROEMS (полиневропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия и синдром кожных изменений), постперфузионного синдрома, синдрома после искусственного кровообращения, посткардиотомного синдрома после инфаркта миокарда, преэклампсии, прогрессирующего супрануклеарного паралича, первичной гипертензии легких, лучевой терапии, феномена и болезни Рейно, болезни Рейно, болезни Рефсума, регулярной тахикардии с узким

комплексом QRS, вазоренальной гипертензии, реперфузионного повреждения, рестриктивной кардиомиопатии, сарком, склеродермии, сенильной хореи, сенильной деменции с тельцами Леви, серонегативных артропатий, шока, серповидноклеточной анемии, отторжения аллотрансплантата кожи, синдрома кожных изменений, отторжения трансплантата тонкого кишечника, солидных опухолей, специфических аритмий, спинальной атаксии, спинозжечковух дегенерации, стрептококкового миозита, структурных повреждений мозжечка, подострого склерозирующего панэнцефалита, обмороков, сифилиса сердечно-сосудистой системы, системной анафилаксии, синдрома системного воспалительного ответа, ювенильного ревматоидного артрита с системным началом, Т-клеточного или FAB ALL, телеангиэктазии, облитерирующего тромбангита, тромбоцитопении, токсичности, трансплантации, травмы/кровопотери, реакций гиперчувствительности типа III, гиперчувствительности типа IV, нестабильной стенокардии, уремии, уросепсиса, крапивницы, заболеваний клапанов сердца, варикоза вен, васкулита, заболеваний вен, венозного тромбоза, фибрилляции желудочков, вирусных и грибковых инфекций, энцефалита с высоким риском смертельного исхода/асептического менингита, гемофагоцитарного синдрома с высоким риском смертельного исхода, синдрома Вернике-Корсакова, болезни Вилсона, отторжения ксенотрансплантата любого органа или ткани, острого коронарного синдрома, острого идиопатического полиневрита, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии, острой ишемии, болезни Стилла взрослых, очаговой алопеции, анафилаксии, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, артериосклероза, атопической экземы, атопического дерматита, аутоиммунного дерматита, аутоиммунного нарушения, связанного со стрептококковой инфекцией, аутоиммунной энтеропатии, аутоиммунной потери слуха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного миокардита, аутоиммунного преждевременного угасания функции яичников, блефарита, бронхоэктазов, буллезного пемфигоида, сердечно-сосудистого заболевания, катастрофического антифосфолипидного синдрома, глютеиновой болезни, шейного спондилеза, хронической ишемии, рубцового пемфигоида, клинически изолированного синдрома (cis) с риском рассеянного склероза, конъюнктивита, психиатрического нарушения с началом в детском возрасте, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), дакриоцистита, дерматомиозита, диабетической ретинопатии, сахарного диабета, грыжи межпозвоночного диска, пролапса межпозвоночного диска, индуцированной лекарственным средством иммунной гемолитической анемии, эндокардита, эндометриоза, эндофтальмита, эписклерита, полиформной эритемы, тяжелой полиформной эритемы, гестационного пемфигоида, синдрома Гийена-Барре, сенной лихорадки, синдрома Хьюза, идиопатической болезни Паркинсона, идиопатической интерстициальной пневмонии, опосредуемой IgE аллергии, иммунной гемолитической анемии, миозита с тельцами включения, инфекционного воспалительного заболевания глаз, воспалительного демиелинизирующего заболевания, воспалительного заболевания сердца, воспалительного заболевания почек, идиопатического пневмосклероза/ идиопатического легочного фиброза, ирита, кератита, сухого кератоконъюнктивита, болезни Куссмауля или болезни Куссмауля-Мейера, паралича Ландри, гистиоцитоза клеток Лангерганса, синдрома мраморной кожи, дегенерации желтого пятна, микроскопического полиангиита, болезни Бехтерева, нарушений двигательных нейронов, пемфигоида слизистых оболочек, полиорганной недостаточности, миастении, миелодиспластического синдрома, миокардита, нарушений корешков нервов, невропатии, не-А не-В гепатита, оптического неврита, остеолитизиса, рака яичника, олигоартикулярного ювенильного ревматоидного артрита, окклюзионного заболевания периферических артерий, заболевания периферических сосудов, заболевания периферических артерий (PAD), флебита, узелкового полиартериита (или нодозного полиартериита), полихондрита, ревматической полимиалгии, полиоза, полиартикулярного ювенильного ревматоидного артрита, синдрома полиэндокринной недостаточности, полимиозита, ревматической полимиалгии (PMR), синдрома после искусственного кровообращения, первичного паркинсонизма, рака предстательной железы и прямой кишки и гемопоэтических злокачественных опухолей (лейкоз и лимфомы), простатита, истинной эритроцитарной аплазии, первичной недостаточности надпочечников, рецидивирующего оптического нейромиелинита, рестеноза, ревматической болезни сердца, SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остеит), склеродермии, вторичного амилоидоза, шокового легкого, склерита, ишиаса, вторичной недостаточности надпочечников, связанного с кремнийорганическими соединениями заболевания соединительных тканей, дерматоза Снеддона-Уилкинсона, анкилозирующего спондилита, синдрома Стивенса-Джонсона, синдрома системного воспалительного ответа, височного артериита, токсоплазменного ретинита, токсического эпидермального некролиза, поперечного миелита, TRAPS (связанный с рецептором фактора некроза опухоли периодический синдром), аллергической реакции I типа, диабета типа II, крапивницы, обычной интерстициальной пневмонии (UIP), васкулита, весеннего конъюнктивита, вирусного ретинита, синдрома Фогта-Коянаги-Харада (синдром VKN), влажной дегенерации желтого пятна, заживления ран и связанной с иерсиниями и сальмонеллами артропатии.

41. Способ лечения опосредованного IL-17A заболевания или нарушения, включающий введение антитела по любому из пп.1-27 или его фрагмента по пп.28-30, нуждающемуся в таком лечении, в терапевтически эффективном количестве.

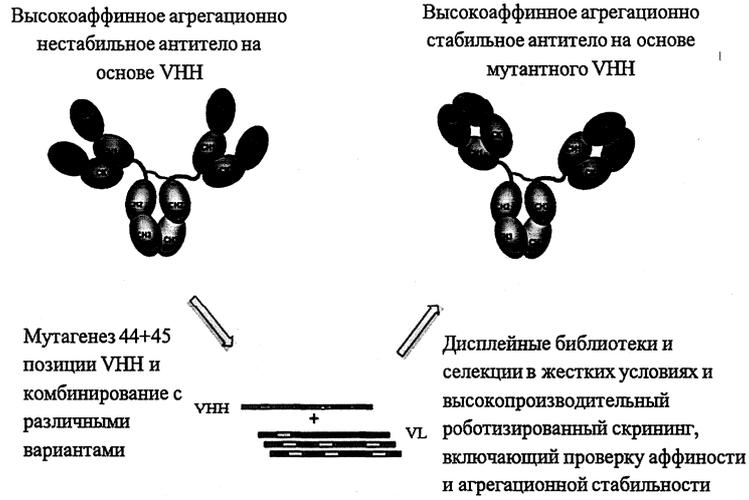
42. Способ лечения опосредованного IL-17A заболевания или нарушения по п.41, где опосредуемое IL-17A заболевание или нарушение выбрано из ревматоидного артрита, остеоартрита, ювенильного хронического артрита, септического артрита, артрита Лайма, псориатического артрита, реактивного артрита,

спондилоартропатии, системной красной волчанки, болезни Крона, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, инсулинзависимого сахарного диабета, тиреоидита, астмы, аллергических заболеваний, псориаза, дерматита, склеродермии, реакции "трансплантат против хозяина", отторжения трансплантата органа, острого или хронического иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, саркоидоза, атеросклероза, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, болезни Кавасаки, болезни Грэйвса, нефротического синдрома, синдрома хронической усталости, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна-Геноха, микроскопического васкулита почек, хронического активного гепатита, увеита, септического шока, синдрома токсического шока, септического синдрома, кахексии, инфекционных заболеваний, паразитарных заболеваний, синдрома приобретенного иммунодефицита, острого поперечного миелита, хореи Гентингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, инсульта, первичного билиарного цирроза, гемолитической анемии, злокачественных опухолей, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, болезни Аддисона, спорадического полигландулярного дефицита типа I и полигландулярного дефицита типа II, синдрома Шмидта, взрослого (острого) респираторного дистресс-синдрома, алопеции, очаговой алопеции, серонегативной артропатии, артропатии, болезни Рейтера, псориазической артропатии, связанной с язвенным колитом артропатии, энтеропатического синовита, связанной с хламидиями, иерсиниями и сальмонеллами артропатии, спондилоартропатии, атероматозного заболевания/артериосклероза, атопической аллергии, аутоиммунного буллезного заболевания, пемфигуса обыкновенного, листовидного пемфигуса, пемфигоида, болезни линейных IgA, аутоиммунной гемолитической анемии, Кумбс-положительной гемолитической анемии, приобретенной пернициозной анемии, ювенильной пернициозной анемии, миалгического энцефалита/синдрома хронической усталости, хронического кожно-слизистого кандидоза, гигантоклеточного артериита, первичного склерозирующего гепатита, криптогенного аутоиммунного гепатита, синдрома приобретенного иммунодефицита, связанных с приобретенным иммунодефицитом заболеваний, гепатита В, гепатита С, варибельного неклассифицируемого иммунодефицита (варибельной неклассифицируемой гипогаммаглобулинемии), кардиомиопатии с дилатацией, женского бесплодия, недостаточности яичников, преждевременного угасания функции яичников, фиброзного заболевания легких, криптогенного фиброзного альвеолита, поствоспалительного интерстициального заболевания легких, интерстициального пневмонита, связанного с болезнью соединительной ткани интерстициального заболевания легких, связанного со смешанной болезнью соединительной ткани заболевания легких, связанного с системной склеродермией заболевания легких, связанного с ревматоидным артритом интерстициального заболевания легких, связанного с системной красной волчанкой заболевания легких, связанного с дерматомиозитом/полимиозитом заболевания легких, связанного с болезнью Шегрена заболевания легких, связанного с анкилозирующим спондилитом заболевания легких, васкулитного диффузного заболевания легких, связанного с гемосидерозом заболевания легких, индуцированного лекарственным средством интерстициального заболевания легких, фиброза, связанного с радиацией фиброза, облитерирующего бронхиолита, хронической эозинофильной пневмонии, заболевания легких с инфильтрацией лимфоцитов, постинфекционного интерстициального заболевания легких, подагрического артрита, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного гепатита I типа (классического аутоиммунного или люпоидного гепатита), аутоиммунного гепатита II типа (гепатита, связанного с антителом против LKM), опосредуемой аутоиммунным заболеванием гипогликемии, устойчивости к инсулину типа В с акантокератодермией, гипопаратиреоза, острого иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, хронического иммунного заболевания, связанного с трансплантацией органа, остеоартроза, первичного склерозирующего холангита, псориаза I типа, псориаза II типа, идиопатической лейкопении, аутоиммунной нейтропении, NOS-болезни почек, гломерулонефрита, микроскопического васкулита почек, болезни Лайма, дискоидной красной волчанки, идиопатического или NOS-мужского бесплодия, аутоиммунитета к сперматозоидам, рассеянного склероза (все подтипы), симпатической офтальмии, легочной гипертензии, вторичной для болезни соединительной ткани, синдрома Гудпасчера, легочного проявления узелкового полиартериита, острой ревматической атаки, ревматоидного спондилита, болезни Стилла, системной склеродермии, синдрома Шенгрена, болезни/артериита Такаэсу, аутоиммунной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопении, аутоиммунного заболевания щитовидной железы, гипертиреоза, зобного аутоиммунного гипотиреоза (болезнь Хашимото), атрофического аутоиммунного гипотиреоза, первичной микседемы, факогенного увеита, первичного васкулита, витилиго, острого заболевания печени, хронического заболевания печени, алкогольного цирроза, индуцированного алкоголем повреждения печени, холестаза, идиосинкразического заболевания печени, индуцированного лекарственным средством гепатита, неалкогольного стеатогепатита, аллергии и астмы, стрептококковой инфекции группы В (GBS), психических расстройств (включая депрессию и шизофрению), опосредуемых типом Th2 и типом Th1 заболеваний, острой и хронической боли (различные формы боли), и злокачественных опухолей, таких как рак легкого, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, толстого кишечника, поджелудочной железы, яичника, предстательной железы и прямой кишки и гемопоэтические злокачественные опухоли (лейкоз и лимфома), абеталипопротеинемии, акроцианоза, острых и хронических паразитарных и инфекционных процессов, острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острой или хронической бактериальной инфекции, острого панкреатита, острой почечной недостаточности, аденокарцином, эктопической систолы предсердий, СПИД-

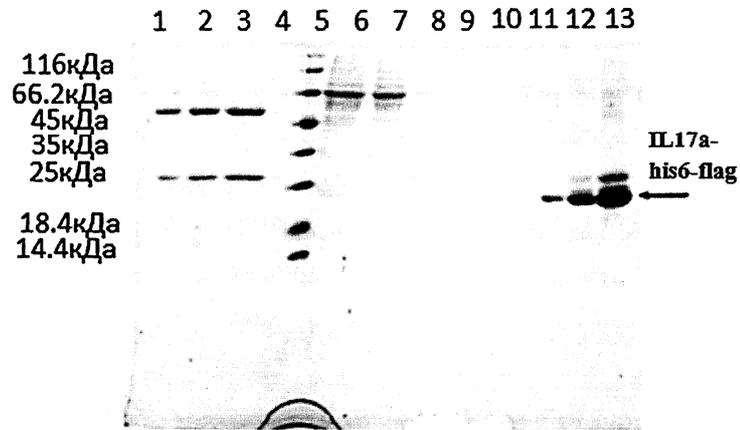
дементного комплекса, индуцированного алкоголем гепатита, аллергического конъюнктивита, аллергического контактного дерматита, аллергического ринита, отторжения аллотрансплантата, дефицита альфа-1-антитрипсина, бокового амиотрофического склероза, анемии, стенокардии, дегенерации клеток передних рогов спинного мозга, терапии против CD3, антифосфолипидного синдрома, реакций гиперчувствительности против рецепторов, аортальных и периферических аневризм, расслоения аорты, артериальной гипертензии, артериосклероза, артериовенозного свища, атаксии, фибрилляции предсердий (постоянной или пароксизмальной), трепетания предсердий, атриовентрикулярной блокады, В-клеточной лимфомы, отторжения трансплантата кости, отторжения трансплантата костного мозга (ВМТ), блокады пучка Гиса, лимфомы Беркитта, ожогов, аритмий сердца, синдрома оглушения сердца, опухолей сердца, кардиомиопатии, воспалительных ответов на искусственное кровообращение, отторжения трансплантата хряща, дегенерации коры головного мозга, нарушений мозжечка, хаотической или многоочаговой тахикардии предсердий, связанных с химиотерапией нарушений, хронического миелоцитарного лейкоза (СМЛ), хронического алкоголизма, хронических воспалительных патологий, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического obstructивного заболевания легких (ХОЗЛ), хронической интоксикации солицилатами, карциномы ободочной и прямой кишки, застойной сердечной недостаточности, конъюнктивита, контактного дерматита, легочного сердца, болезни коронарных артерий, болезни Крейтцфельда-Якоба, культурально-негативного сепсиса, кистозного фиброза, связанных с цитокиновой терапией нарушений, деменции боксеров, демиелинизирующих заболеваний, геморрагической лихорадки денге, дерматита, дерматологических состояний, диабета, сахарного диабета, диабетического атеросклеротического заболевания, диффузного заболевания с тельцами Леви, застойной кардиомиопатии с дилатацией, нарушений базальных ганглиев, синдрома Дауна в среднем возрасте, двигательных нарушений, индуцированных лекарственным средством, которое блокирует дофаминовые рецепторы ЦНС, чувствительности к лекарственным средствам, экземы, энцефаломиелита, эндокардита, эндокринопатии, эпиглоттита, инфекции вирусом Эпштейна-Барр, эритро мелалгии, экстрапирамидальных и мозжечковых нарушений, семейного гематофагоцитарного лимфогистиоцитоза, отторжения имплантата эмбрионального тимуса, наследственной атаксии Фридрейха, функциональных нарушений периферических артерий, грибкового сепсиса, газовой гангрены, язвы желудка, гломерулонефрита, отторжения трансплантата любого органа или ткани, грамотрицательного сепсиса, грамположительного сепсиса, гранулем вследствие внутриклеточных организмов, волосатоклеточного лейкоза, болезни Галлервордена-Шпатца, тиреоидита Хашимото, сенной лихорадки, отторжения трансплантата сердца, гемахроматоза, гемодиализа, гемолитического уремического синдрома/тромболитической тромбоцитопенической пурпурой, кровопотери, гепатита (А), аритмий пучка Гиса, ВИЧ-инфекции/ВИЧ-невропатии, болезни Ходжкина, гиперкинетических двигательных нарушений, реакций гиперчувствительности, связанного с гиперчувствительностью пневмонита, гипертензии, гипокинетических двигательных нарушений, обследования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, идиопатической болезни Аддисона, идиопатического фиброза легких, опосредуемой антителами цитотоксичности, астении, младенческой спинальной мышечной атрофии, воспаления аорты, вируса гриппа А, облучения ионизирующей радиацией, иридоциклита/увеита/оптического неврита, повреждения при ишемии-реперфузии, ишемического инсульта, ювенильного ревматоидного артрита, ювенильной спинальной мышечной атрофии, саркомы Капоши, отторжения трансплантата почки, легионеллеза, лейшманиоза, лепры, повреждений кортикоспинальной системы, жирового отека, отторжения трансплантата печени, лимфатического отека, малярии, злокачественной лимфомы, злокачественного гистиоцитоза, злокачественной меланомы, менингита, менингококкемии, метаболических/идиопатических заболеваний, мигрени, митохондриального полисистемного нарушения, смешанной болезни соединительной ткани, моноклональной гаммапатии, множественной миеломы, полисистемной дегенерации (Менцеля, Дежерина-Тома, Шая-Дрейджера и Мачадо-Джозефа), миастении, внутриклеточных *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, миелодиспластического синдрома, инфаркта миокарда, ишемических нарушений миокарда, карциномы носоглотки, хронического заболевания легких новорожденных, нефрита, нефроза, нейродегенеративных заболеваний, нейрогенных мышечных атрофии I, нейтропенической лихорадки, неходжкинских лимфом, окклюзии брюшного отдела аорты и ее ветвей, окклюзионных нарушений артерий, терапии ОКТ3®, орхита/эпидидимита, орхита/возвратных процедур после вазэктомии, органомегалии, остеопороза, отторжения трансплантата поджелудочной железы, карциномы поджелудочной железы, паранеопластического синдрома/гиперкальцемии при злокачественной опухоли, отторжения трансплантата паращитовидной железы, воспалительного заболевания органов таза, круглогодичного ринита, заболевания перикарда, периферического артериосклеротического заболевания, периферических сосудистых нарушений, перитонита, пернициозной анемии, пневмонии *Pneumocystis carinii*, пневмонии, синдрома ROEMS (полиневропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия и синдром кожных изменений), постперфузионного синдрома, синдрома после искусственного кровообращения, посткардиотомного синдрома после инфаркта миокарда, преэклампсии, прогрессирующего супрануклеарного паралича, первичной гипертензии легких, лучевой терапии, феномена и болезни Рейно, болезни Рейно, болезни Рефсума, регулярной тахикардии с узким комплексом QRS, вазоренальной гипертензии, реперфузионного повреждения, рестриктивной кардиомиопатии, сарком, склеродермии, сенильной хореи, сенильной деменции с тельцами Леви, серонегатив-

ных артропатий, шока, серповидноклеточной анемии, отторжения аллотрансплантата кожи, синдрома кожных изменений, отторжения трансплантата тонкого кишечника, солидных опухолей, специфических аритмий, спинальной атаксии, спинозжечков дегенерации, стрептококкового миозита, структурных повреждений мозжечка, подострого склерозирующего панэнцефалита, обмороков, сифилиса сердечно-сосудистой системы, системной анафилаксии, синдрома системного воспалительного ответа, ювенильного ревматоидного артрита с системным началом, Т-клеточного или FAB ALL, телеангиэктазии, облитерирующего тромбоза, тромбоцитопении, токсичности, трансплантации, травмы/кровопотери, реакций гиперчувствительности типа III, гиперчувствительности типа IV, нестабильной стенокардии, уремии, уросепсиса, крапивницы, заболеваний клапанов сердца, варикоза вен, васкулита, заболеваний вен, венозного тромбоза, фибрилляции желудочков, вирусных и грибковых инфекций, энцефалита с высоким риском смертельного исхода/асептического менингита, гемофагоцитарного синдрома с высоким риском смертельного исхода, синдрома Вернике-Корсакова, болезни Вилсона, отторжения ксенотрансплантата любого органа или ткани, острого коронарного синдрома, острого идиопатического полиневрита, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии, острой ишемии, болезни Стилла взрослых, очаговой алопеции, анафилаксии, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, артериосклероза, атопической экземы, атопического дерматита, аутоиммунного дерматита, аутоиммунного нарушения, связанного со стрептококковой инфекцией, аутоиммунной энтеропатии, аутоиммунной потери слуха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного миокардита, аутоиммунного преждевременного угасания функции яичников, блефарита, бронхоэктазов, буллезного пемфигоида, сердечно-сосудистого заболевания, катастрофического антифосфолипидного синдрома, глютеиновой болезни, шейного спондилеза, хронической ишемии, рубцового пемфигоида, клинически изолированного синдрома (cis) с риском рассеянного склероза, конъюнктивита, психиатрического нарушения с началом в детском возрасте, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), дакриоцистита, дерматомиозита, диабетической ретинопатии, сахарного диабета, грыжи межпозвоночного диска, пролапса межпозвоночного диска, индуцированной лекарственным средством иммунной гемолитической анемии, эндокардита, эндометриоза, эндофтальмита, эписклерита, полиформной эритемы, тяжелой полиформной эритемы, гестационного пемфигоида, синдрома Гийена-Барре, сенной лихорадки, синдрома Хьюза, идиопатической болезни Паркинсона, идиопатической интерстициальной пневмонии, опосредуемой IgE аллергии, иммунной гемолитической анемии, миозита с тельцами включения, инфекционного воспалительного заболевания глаз, воспалительного демиелинизирующего заболевания, воспалительного заболевания сердца, воспалительного заболевания почек, идиопатического пневмосклероза/ идиопатического легочного фиброза, ирита, кератита, сухого кератоконъюнктивита, болезни Куссмауля или болезни Куссмауля-Мейера, паралича Ландри, гистиоцитоза клеток Лангерганса, синдрома мраморной кожи, дегенерации желтого пятна, микроскопического полиангиита, болезни Бехтерева, нарушений двигательных нейронов, пемфигоида слизистых оболочек, полиорганной недостаточности, миастении, миелодиспластического синдрома, миокардита, нарушений корешков нервов, невропатии, не-А не-В гепатита, оптического неврита, остеопороза, рака яичника, олигоартикулярного ювенильного ревматоидного артрита, окклюзионного заболевания периферических артерий, заболевания периферических сосудов, заболевания периферических артерий (PAD), флебита, узелкового полиартериита (или нодозного полиартериита), полихондрита, ревматической полимиалгии, полиоза, полиартикулярного ювенильного ревматоидного артрита, синдрома полиэндокринной недостаточности, полимиозита, ревматической полимиалгии (PMR), синдрома после искусственного кровообращения, первичного паркинсонизма, рака предстательной железы и прямой кишки и гемопоэтических злокачественных опухолей (лейкоз и лимфому), простатита, истинной эритроцитарной аплазии, первичной недостаточности надпочечников, рецидивирующего оптического нейромиелинита, рестеноза, ревматической болезни сердца, SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остейт), склеродермии, вторичного амилоидоза, шокового легкого, склерита, ишиаса, вторичной недостаточности надпочечников, связанного с кремнийорганическими соединениями заболевания соединительных тканей, дерматоза Снеддона-Уилкинсона, анкилозирующего спондилита, синдрома Стивенса-Джонсона, синдрома системного воспалительного ответа, височного артериита, токсоплазменного ретинита, токсического эпидермального некролиза, поперечного миелита, TRAPS (связанный с рецептором фактора некроза опухоли периодический синдром), аллергической реакции I типа, диабета типа II, крапивницы, обычной интерстициальной пневмонии (UIP), васкулита, весеннего конъюнктивита, вирусного ретинита, синдрома Фогта-Коянаги-Харада (синдром VKH), влажной дегенерации желтого пятна, заживления ран и связанной с иерсиниями и сальмонеллами артропатии.

43. Способ лечения по п.41, дополнительно включающий введение ингибиторов ФНО- $\alpha$ .



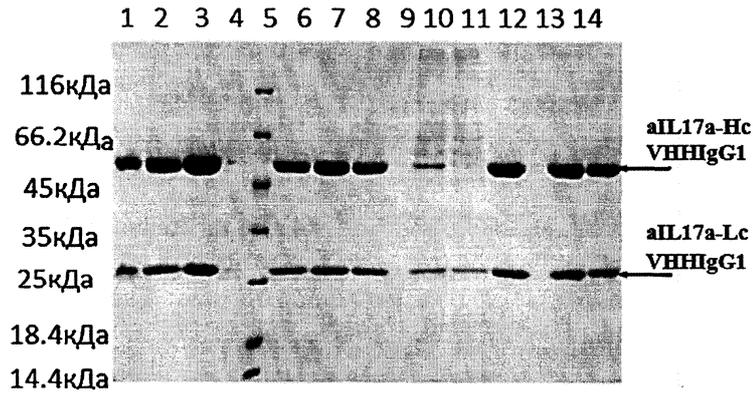
Фиг. 1



А-препарат рекомбинантного IL17A-His6-FLAG человека (15% PAGE+  $\beta$ -ME).

- |  |                    |
|--|--------------------|
| 1) 9E10 0.25 мкг + $\beta$ -ME         | 8) Отмывка 1       |
| 2) 9E10 0,5 мкг + $\beta$ -ME          | 9) Отмывка 2       |
| 3) 9E10 1 мкг + $\beta$ -ME            | 10) Отмывка 3      |
| 4) ---                                 | 11) Элюция 2.5 мкл |
| 5) Ферментный маркер неокрашенный      | 12) Элюция 5 мкл   |
| 6) Среда до нанесения на IMACBioRad    | 13) Элюция 10 мкл  |
| 7) Среда после нанесения на IMACBioRad |                    |

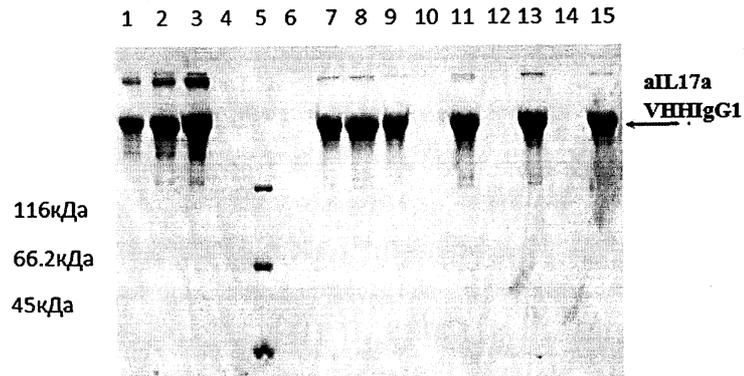
Фиг. 2



В - препараты VHHIgG1 с различными аминокислотными заменами в позиции 45 VHH домена (12% PAGE+  $\beta$ -МЕ).

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1) Control IgG1 2.5 мкг        | 8) VHHIgG1 aIL17 F45/K8 5 мкл           |
| 2) Control IgG1 5 мкг          | 9) -                                    |
| 3) Control IgG1 10 мкг         | 10) VHHIgG1 aIL17 G45/K8 кж до 5 мкл    |
| 4) -                           | 11) VHHIgG1 aIL17 G45/K8 кж после 5 мкл |
| 5) <u>Ферментный РВ маркер</u> | 12) VHHIgG1 aIL17 G45/K85 мкл           |
| <u>неокрашенный</u>            | 13) -                                   |
| 6) VHHIgG1 aIL17 A45/K8 5 мкл  | 14) VHHIgG1 aIL17 H45/K8 5 мкл          |
| 7) VHHIgG1 aIL17 D45/K8 5 мкл  | 15) VHHIgG1 aIL17 I45/K8 5 мкл          |

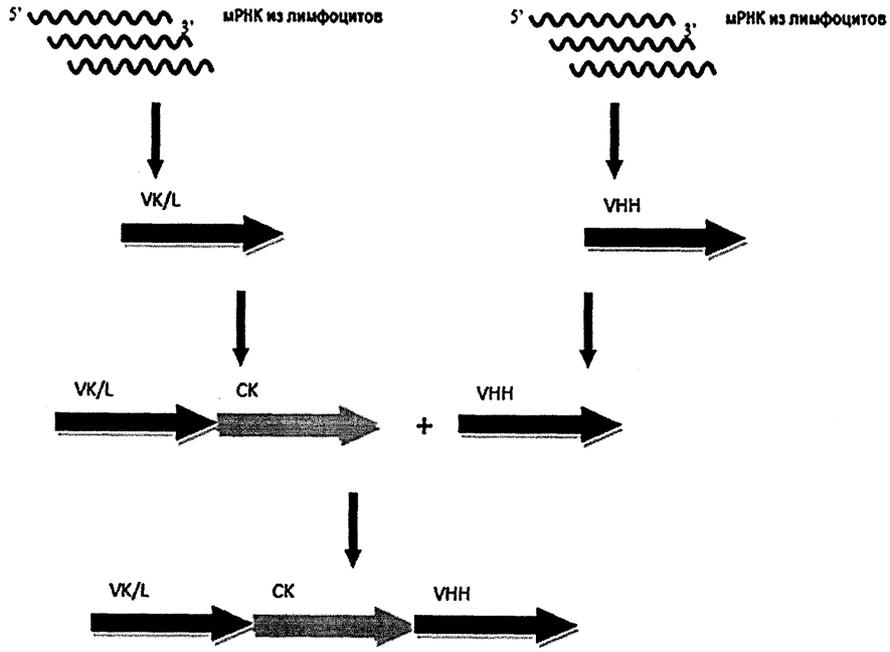
Фиг. 3



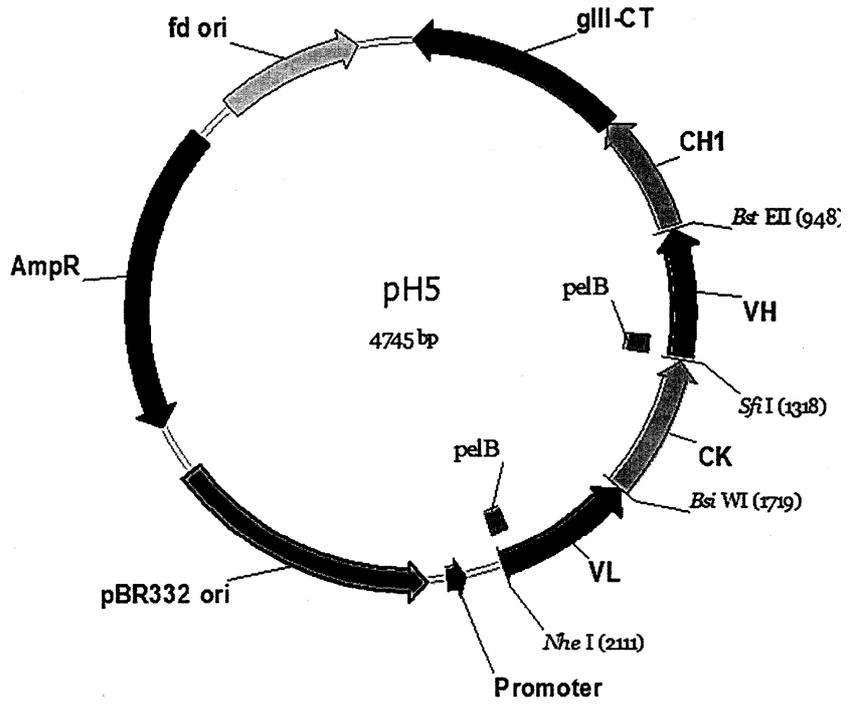
С - препараты VHHIgG1 с различными аминокислотными заменами в позиции 45 VHH домена (8% PAGE без  $\beta$ -МЕ)

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1) Control IgG1 2.5 мкг        | 9) VHHIgG1 aIL17 F45/K8 5 мкл           |
| 2) Control IgG1 5 мкг          | 10) -                                   |
| 3) Control IgG1 10 мкг         | 11) VHHIgG1 aIL17 G45/K8 кж до 5 мкл    |
| 4) -                           | 12) -                                   |
| 5) <u>Ферментный РВ маркер</u> | 13) VHHIgG1 aIL17 H45/K8 кж после 5 мкл |
| <u>неокрашенный</u>            | 14) -                                   |
| 6) -                           | 15) VHHIgG1 aIL17 I45/K8 5 мкл          |
| 7) VHHIgG1 aIL17 A45/K85 мкл   |   |
| 8) VHHIgG1 aIL17 D45/K8 5 мкл  |   |

Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

## A

## 1VHH

QVQLQQSGGGSVQTGGSLTLTCAASGLTFFEANSLGWFRQSPGKEREVFAAVSPTKRIDVADS  
 VKGRFFISRDNMTNTVYLQMNLSLKPEDTGIYTCADPILLISNKRANI-----  
 WGQGTMTVTVSS

## 2VHH

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASPRVVISIHDMAWYROAPGKERELVAGITTRGITDYGYS  
 VKGRFTISRDDAKNTLFLQMNLDLKPEDTAVYYCNLRHYEV-----  
 WGQGTTLVTVSS

## 3VHH

QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGTFATSPMGWFRQAPGKEREGVAALSPSGGDRIYDD  
 SVKGRFTISRDNAGYFIYLYQMNLSLKPEDTARYYCAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTTLVTVS  
 S

## B

VK4B11DVVMTQSPSSVTASAGETVVTINCKSSQSVAYKSNQKNYLAWYQORPGQSPRLLIYY  
 ASTRISGVPDRFSGSGSTTDFTLTISSEFQPEDAAVYYCOQYSAPYSFGSGTKLEIK

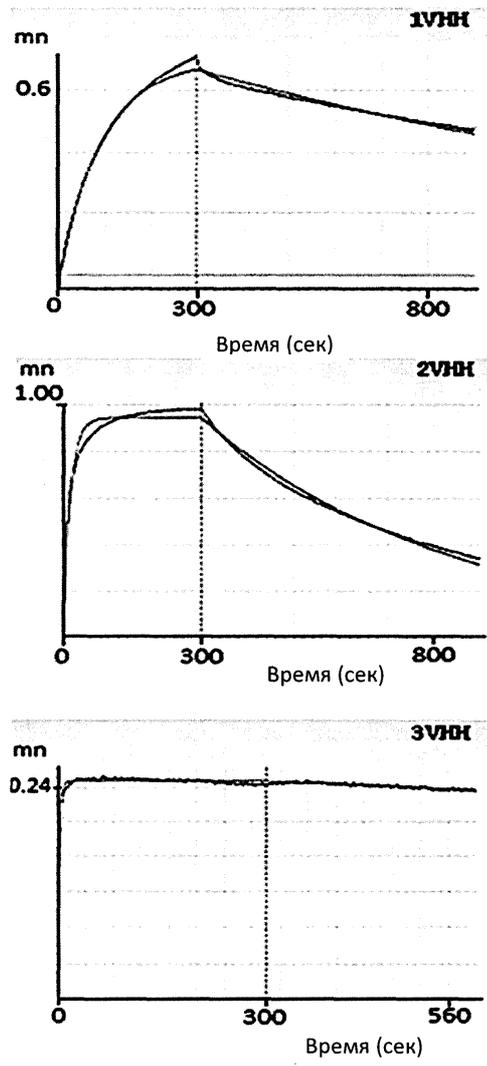
## VLB5

AVLTQLSSMSGSPGQTVTITCTGSIITNIGQYRVNWXHLPGTAPKLLIYSNANRVSGVPDRF  
 SSKSGSTASLTIAGVQAEDEADYYCSAWDGSLLNGYVFGGGTKVTVLQR

VLF4QAVLTQPPSVSGSPGQTVTISCITGTSDDVSGNYVSWYQOVPGMAPKLLIYNAGTRRA  
 GITGRFSASKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASVKKINKYVFGGGTKLTVLQR

Фиг. 7

С



Фиг. 8

**Wild 3VHHFab**

QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKERE  
FVAAISPSGGDRIYDDSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY  
CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGLVTVSS

**mut1**

QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGLE  
FVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY  
CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGLVTVSS

**mut2**

QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGRE  
WVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARY  
YCAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGLVTVSS

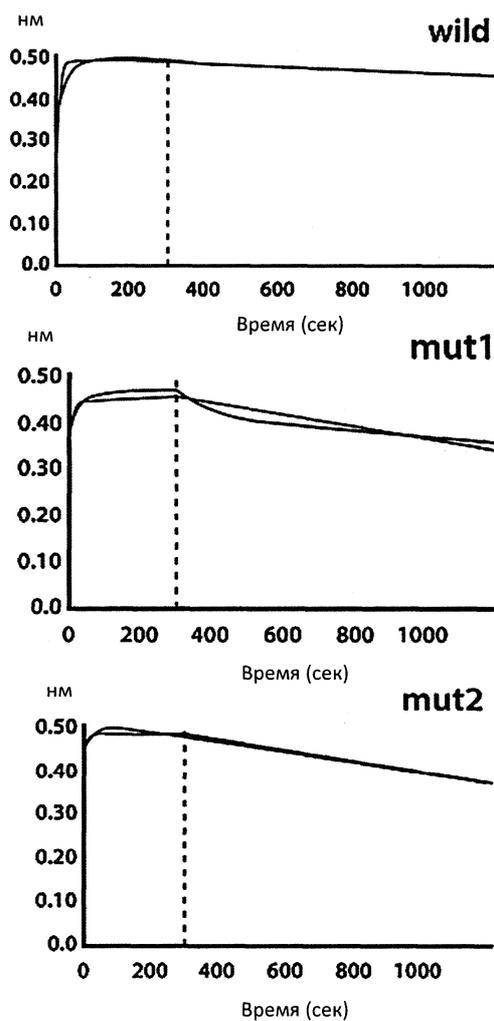
**mut3**

QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKLEF  
VAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY  
CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGLVTVSS

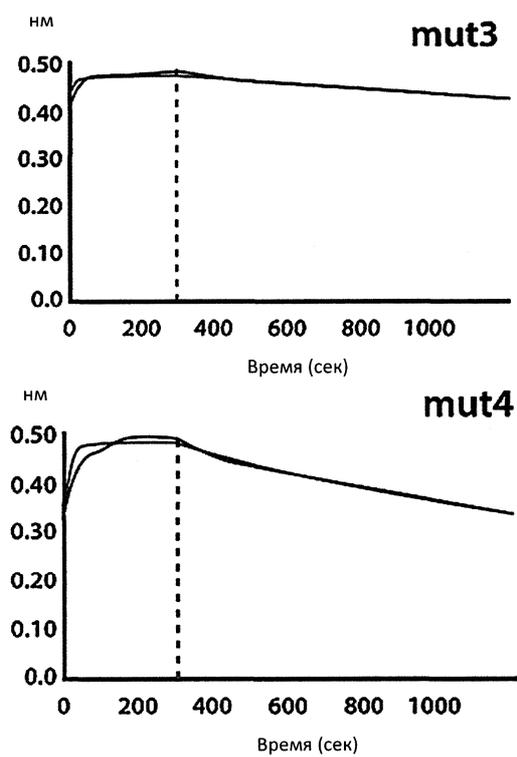
**mut4**

QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGRE  
FVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY  
CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGLVTVSS

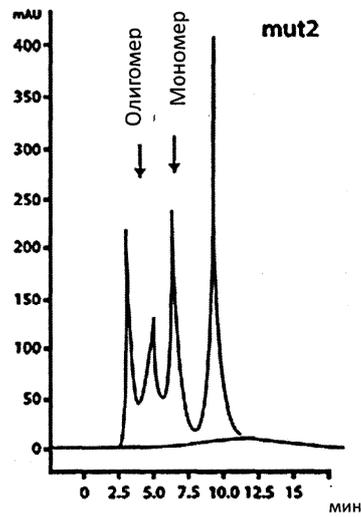
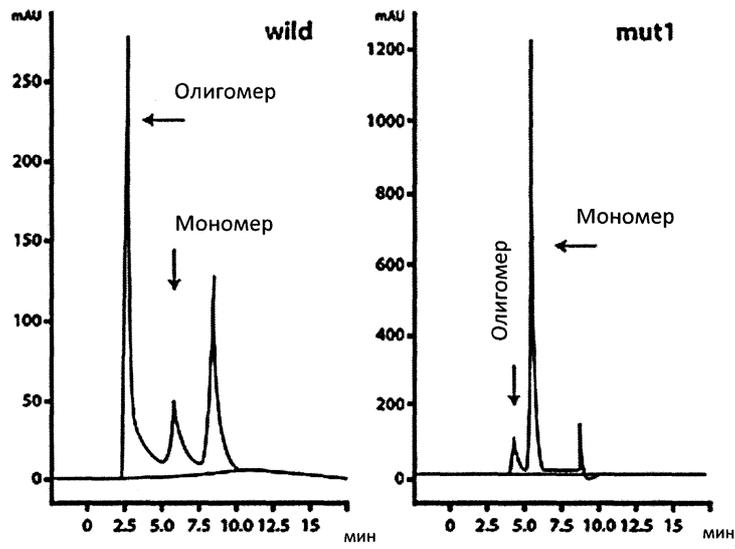
Фиг. 9



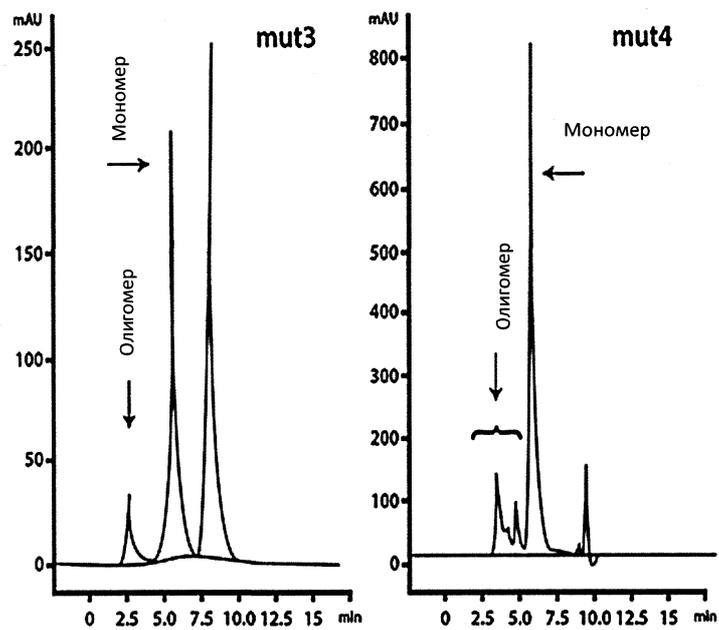
Фиг. 10



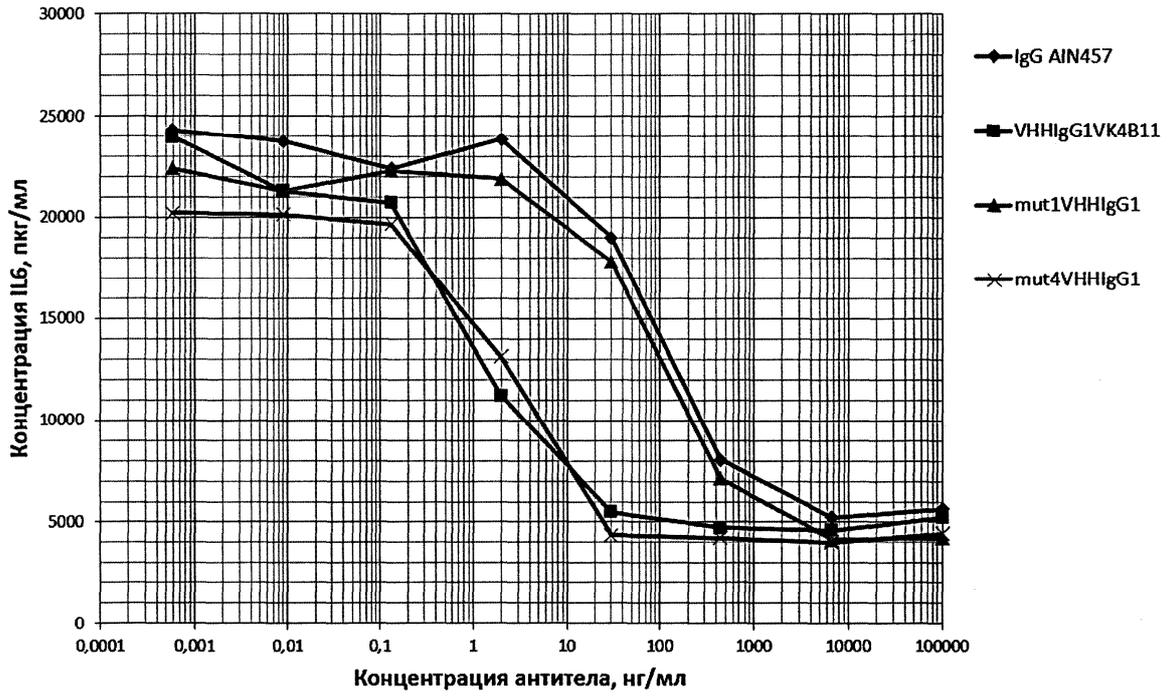
Фиг. 11



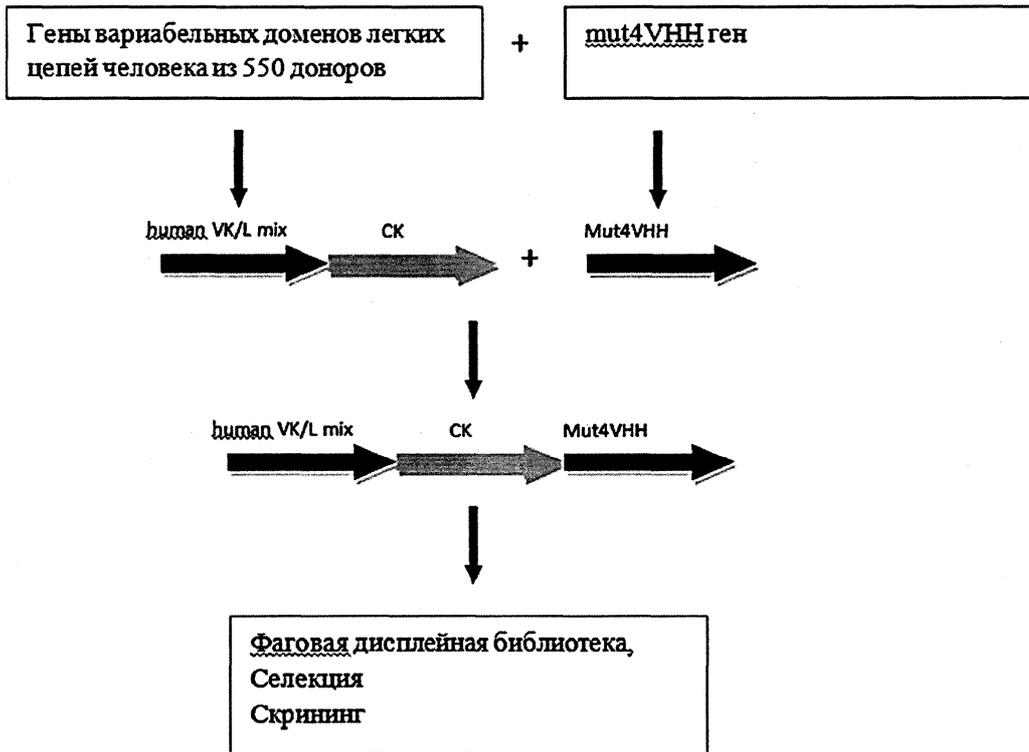
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

B

VK1A7

EIVLTQSPASLSASVGRVDITCOASQSINNKIAWYQOKPGKPPKVLIIYAASKLP  
 TGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLSLOAEDVATYYCLODYNWPTFGAGTKLEIK

VK3c18

EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASSR  
 ATGIPDRFRSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYSYSPVTFGQGTKVEIK

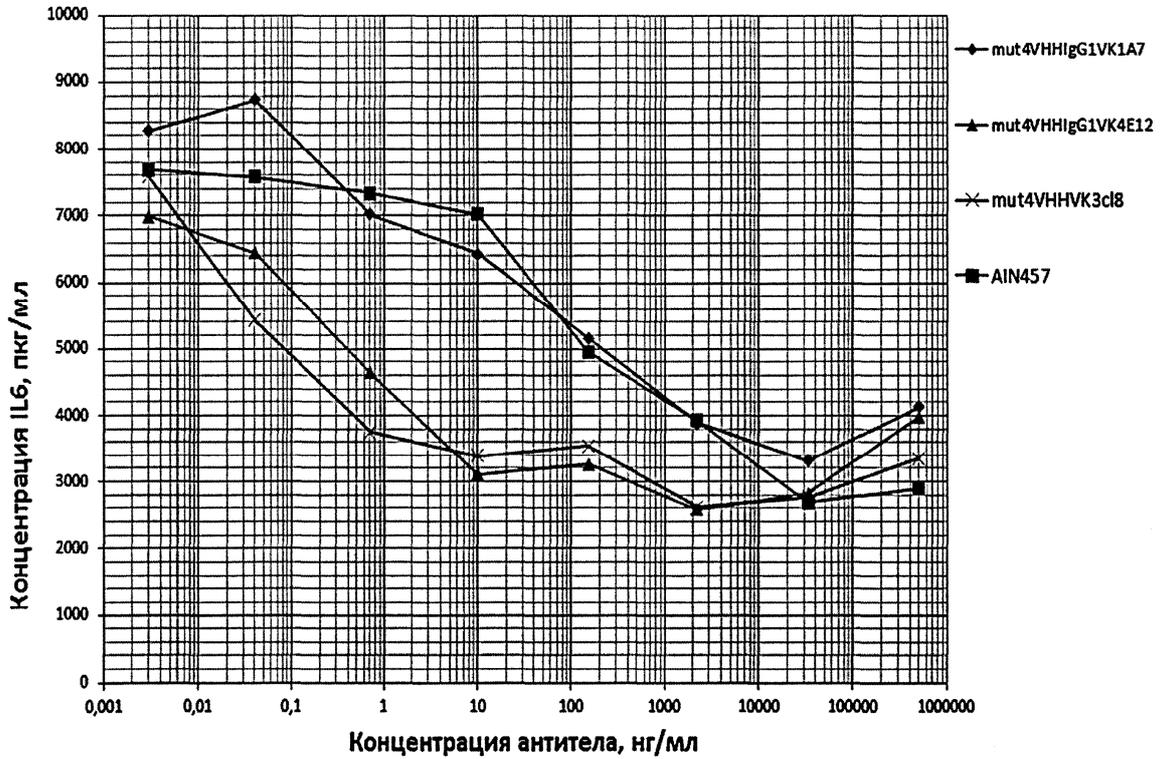
VK3c118

EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSR  
 ATGIPDRFRSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYIYSPVTFGQGTKVEIK

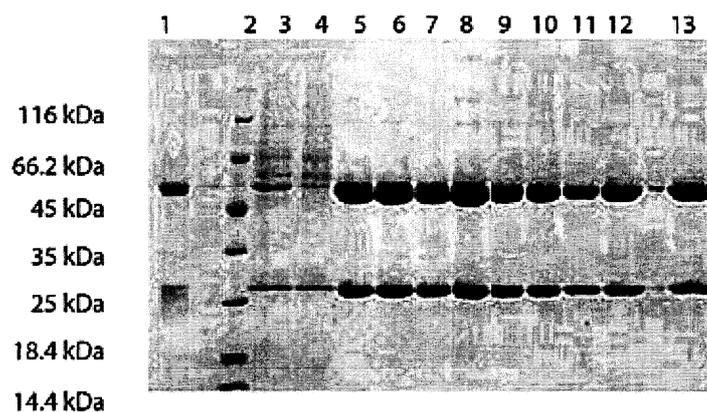
VK4E12

DIQLTQSPSSLSASAGETASINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQOKPGQPPKLLIY  
 WASTRESGVPDRFRSGSGSGTDFTLTISLSQSEDAVYYCQOQYSTPHTFGQGTKV  
 EIK

Фиг. 16

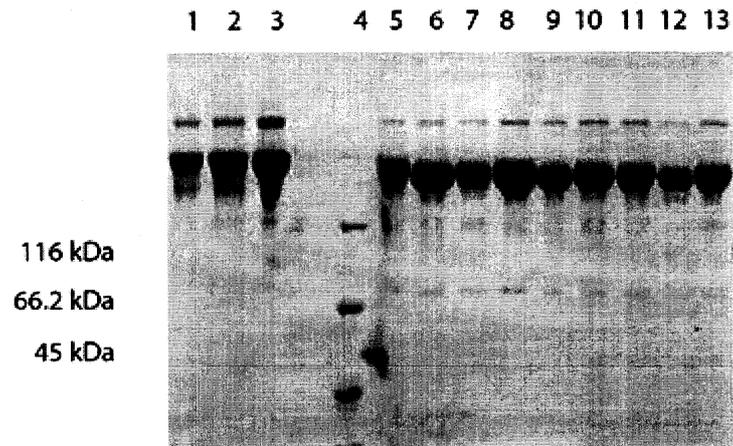


Фиг. 17

Гель электрофорез в 12% PAGE+  $\beta$ -ME

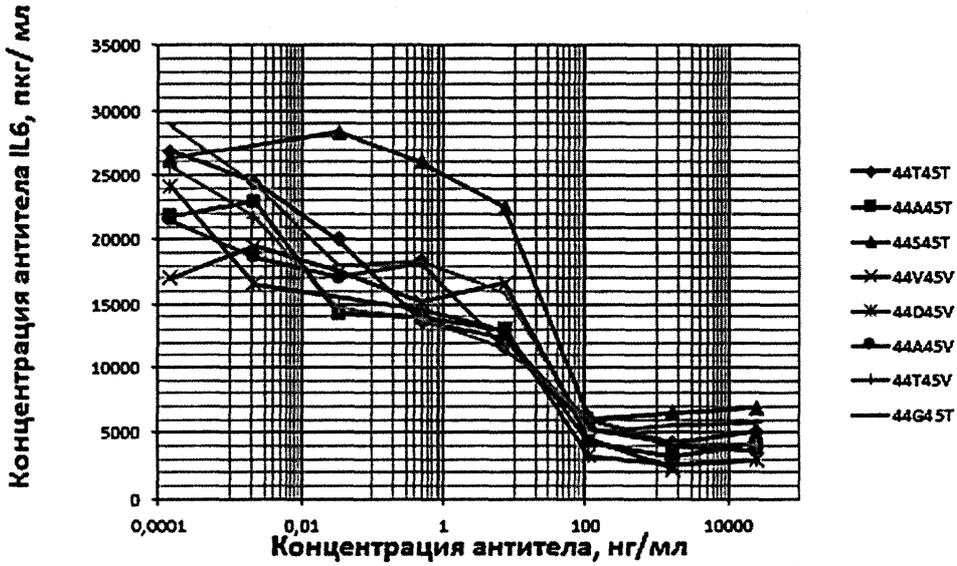
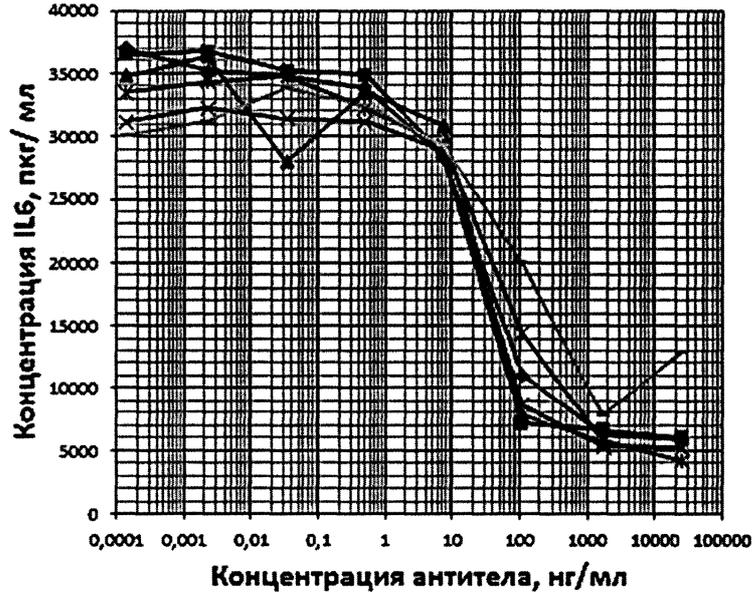
1) Контроль IgG1	2.5 мкг
2) Неокрашенный маркер <i>Fermentas</i>	
3) 44V45T VHHIgG1c8	кж до очистки 10 мкл
4) 44V45T VHHIgG1c8	кж после очистки 10 мкл
5) 44V45T VHHIgG1c8	5 мкл
6) 44D45T VHHIgG1c8	5 мкл
7) 44T45T VHHIgG1c5	5 мкл
8) 44A45T VHHIgG1c8	5 мкл
9) 44S45T VHHIgG1c8	5 мкл
10) 44V45V VHHIgG1c8	5 мкл
11) 44D45V VHHIgG1c8	5 мкл
12) 44A45V VHHIgG1c8	5 мкл
13) 44T45V VHHIgG1c8	5 мкл

Фиг. 18

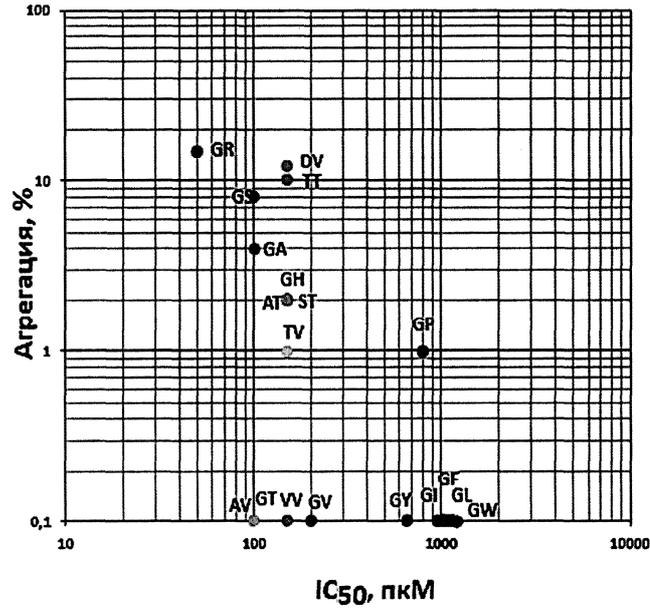
Гель электрофорез в 12% PAGE+  $\beta$ -ME

1) Контроль IgG1	2.5 мкг
2) Контроль IgG1	5 мкг
3) Контроль IgG1	10 мкг
4) Неокрашенный маркер Fermentas PW marker	
5) 44V45T VHHIgG1c8	5 мкл
6) 44D45T VHHIgG1c8	5 мкл
7) 44T45T VHHIgG1c8	5 мкл
8) 44A45T VHHIgG1c8	5 мкл
9) 44S45T VHHIgG1c8	5 мкл
10) 44V45V VHHIgG1c8	5 мкл
11) 44D45V VHHIgG1c8	5 мкл
12) 44A45V VHHIgG1c8	5 мкл
13) 44T45V VHHIgG1c8	5 мкл

Фиг. 19

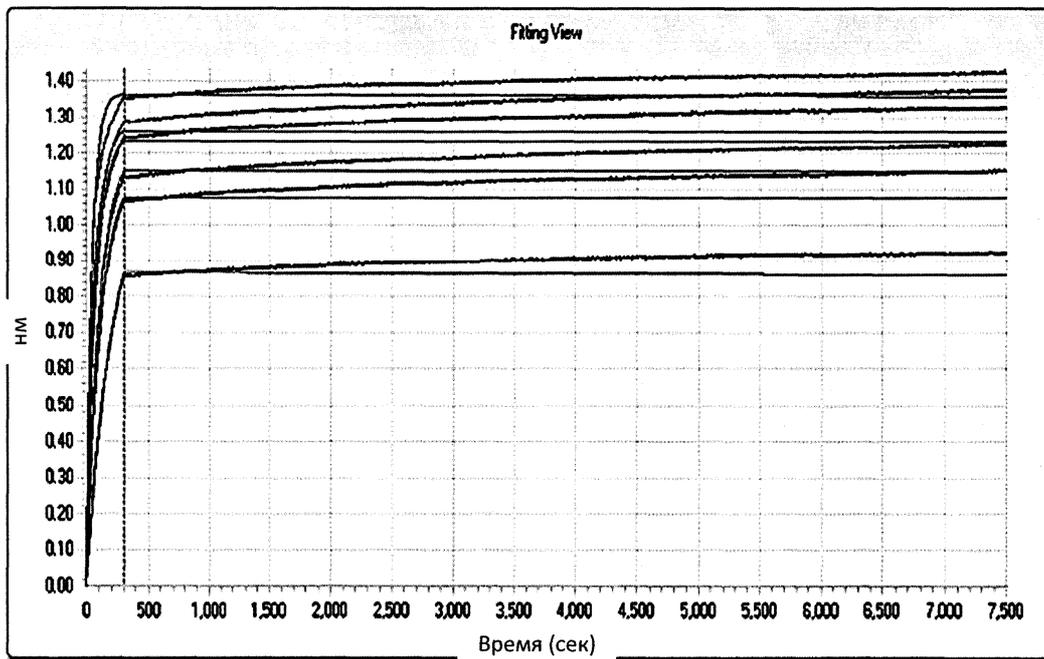


Фиг. 20



Жирным пунктиром выделены комбинации, обуславливающие максимально сбалансированные значения агрегационной стабильности и функциональной активности. Бледным пунктиром – удовлетворительные значения по агрегационной стабильности при сохранении высокой аффинности.

Фиг. 21



Фиг. 22

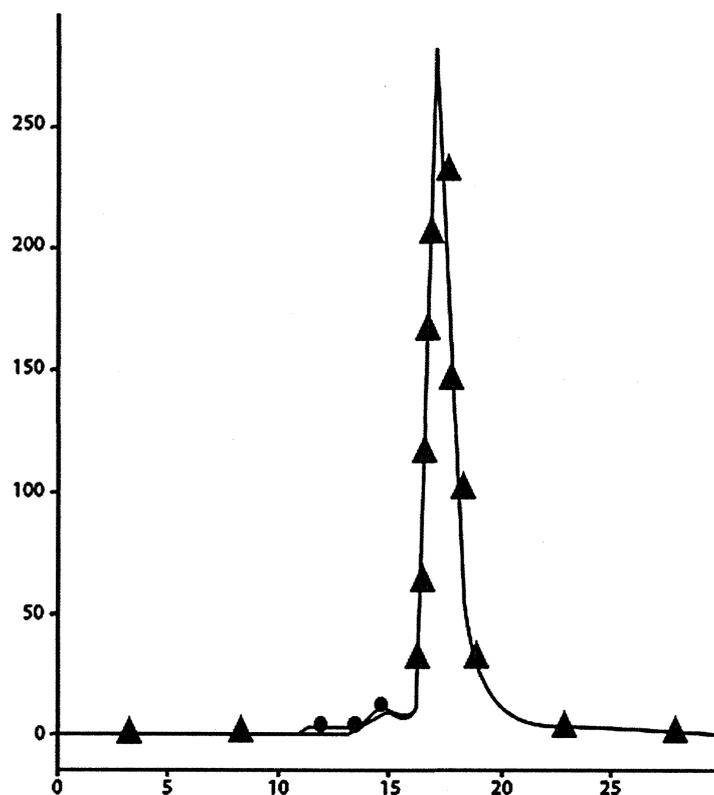
## анти-IL17ABCD-109 сIL17 Фсчеловека

Кандидат (nM)	Ответ	KD (M)	$k_{on}(1/Mc)$	$k_{on}$	$k_{dis}(1/c)$	$k_{dis}$	Full R <sup>2</sup>
68,6	1,2363	<1.0E-12	2,00E+05	3,28E+03	<1.0E-07		0,383582
34,3	1,06	<1.0E-12	2,61E+05	3,72E+03	<1.0E-07		0,744563
17,1	0,845	4,40E-12	2,82E+05	6,65E+03	1,24E-06	2,61E-07	0,775434

## анти-IL17A BCD-109 с IL17 Фс макаки

Кандидат (nM)	Ответ	KD (M)	$k_{on}(1/Mc)$	$k_{on}$	$k_{dis}(1/c)$	$k_{dis}$	Full R <sup>2</sup>
68,7	1,3497	<1.0E-12	3,24E+05	3,22E+03	2,36E-07	1,71E-07	0,672159
34,4	1,2814	<1.0E-12	4,26E+05	8,35E+03	<1.0E-07		0,061979
17,2	1,127	<1.0E-12	5,71E+05	7,48E+03	<1.0E-07		0,753773

Фиг. 23



▲ хроматографический профиль антитела до прогрева

● хроматографический профиль антитела после прогрева

Концентрация белка выровнена и составляет около 10 мг/мл, ФСБ.

Фиг. 24



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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