

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092162 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.01

(22) Дата подачи заявки
2019.09.18

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CXCL13 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА

(31) PCT/CN2018/106158

(32) 2018.09.18

(33) CN

(86) PCT/CN2019/106409

(87) WO 2020/057540 2020.03.26

(71) Заявитель:
АЙ-МАБ БИОФАРМА ЮЭС
ЛИМИТЕД (US)

(72) Изобретатель:
Гу Хайцзюань, Ян Цюмэй (CN)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены антитела или их фрагменты, обладающие специфичностью связывания белка хемокина с (С-Х-С-мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека. В различных примерах антитела или их фрагменты включают области CDR VH и VL, описанные в настоящем документе, или их варианты. Также предложены способы применения указанных антител или их фрагментов для лечения аутоиммунных заболеваний и нарушений.

A1

202092162

202092162

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CXCL13 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Хемокин (с С-Х-С-мотивом)-лиганд 13 (CXCL13), также известный как хемоаттрактант В-лимфоцитов (BLC) или привлекающий В-клетки хемокин 1 (BCA-1), представляет собой белковый лиганд, у человека кодируемый геном CXCL13. CXCL13 представляет собой хемокин небольшого размера, принадлежащий к семейству хемокинов CXС. Как следует из названия, указанный хемокин является избирательно хемотактическим в отношении В-клеток, принадлежащих как к подгруппе В-1, так и к подгруппе В-2, и оказывает эффекты за счет взаимодействия с рецептором хемокинов CXCR5.

CXCL13 и его рецептор CXCR5 контролируют организацию В-клеток в фолликулах лимфоидных тканей, он характеризуется высоким уровнем экспрессии в печени, селезенке, лимфатических узлах и кишечнике человека. Ген CXCL13 локализован на хромосоме 4 человека в кластере других CXС-хемокинов.

Считается, что в Т-лимфоцитах экспрессия CXCL13 отражает происхождение Т-клетки из зародышевого центра, в частности, подгруппы Т-клеток, называемых фолликулярными В-хелперными Т-клетками (или TFH-клетками). Соответственно, считается, что экспрессия CXCL13 в Т-клеточных лимфомах, таких как ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, отражает происхождение неопластических Т-клеток из зародышевого центра.

Потребность в средствах терапии, нацеленных на опосредованные CXCL13 сигнальные пути, становится все более очевидной в последние годы. Механизмы действия таких средств лечения могут включать, например, блокаду взаимодействия CXCL13 с его рецептором, приводящую к вмешательству в миграцию В-клеток и фолликулярных В-хелперных Т-клеток в воспаленные ткани и формирование зародышевого центра (например, в случае аутоиммунного заболевания), и ингибированию пролиферации и способности к распространению раковых клеток при онкологических нарушениях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены антитела или их фрагменты, обладающие специфичностью связывания белка хемокина (с С-Х-С-мотивом)- лиганда 13 (CXCL13) человека, а также биспецифические антитела, обладающие специфичностью в отношении CXCL13 и другого антигена, такого как BAFF и ИФН α RI. Указанные антитела и фрагменты подходят для применения при лечении аутоиммунных заболеваний, а также рака.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с С-Х-С мотивом)- лиганда 13 (CXCL13) человека, причем указанное антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где: указанная HCDR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:127 (RYWMS); указанная HCDR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:128 (EINPDSSTINYAPSLKD), SEQ ID NO:129 (EINPESSTINYAPSLKD), SEQ ID NO:340 (EINPEASSINYAPSLKD), SEQ ID NO:343, (EINPEAGKWNYPAPSLKD), SEQ ID NO:347 (EINPETTIINYAPSLKD), SEQ ID NO:349 (EINPESTLINYPAPSLKD), SEQ ID NO:351, INPESTGINYPAPSLKD), SEQ ID NO:354 (EINPESNFINYAPSLKD), SEQ ID NO:357 (EINPERNYINYAPSLKD), SEQ ID NO:369 (EINPEASTINYAPSLKD) или SEQ ID NO:370 (EINPESSSINYAPSLKD); указанная HCDR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:130 (QDDYEYYAMDY), SEQ ID NO:341 (QDDYSHYAMDY), SEQ ID NO:344 (QDDYTTYAMDY), SEQ ID NO:345 (QDDYLTYYAMDY), SEQ ID NO:348 (QDDYRHYAMDY), SEQ ID NO:350 (QDDYRNYAMDY), SEQ ID NO:352 (QDDYWYYAMDY), SEQ ID NO:355 (QDDYSVYYAMDY), SEQ ID NO:358 (QDDYDKYYAMDY), SEQ ID NO:359 (QDDYEYYTMDY), SEQ ID NO:362 (QDDYEYYALDY), SEQ ID NO:365 (QDDTRYYYAMDY), SEQ ID NO:366 (QDDYLYYTMDY), SEQ ID NO:367 (QDDYETYTMDY), SEQ ID NO:368 (QDDYLTYYTMDY), SEQ ID NO:371 (QDDYSYYTMDY), SEQ ID NO:372 (QDDYEHYYTMDY) или SEQ ID NO:373 (QDDYSHYYTMDY); указанная LCDR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:131 (KASQDVNTGVA), SEQ ID NO:342 (KASQDVNTGVV), SEQ ID NO:346 (KASQDVNTAVD), SEQ ID NO:353

(KASQDVNTAVS), SEQ ID NO:356 (KASQDVNTGVT), SEQ ID NO:360 (KVSQDVNTGVA) или SEQ ID NO:363 (KASQDVNTGVY); указанная LCDR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:132 (SASYRYT); и указанная LCDR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:133 (QQYYSTPLT), SEQ ID NO:361 (QQYWSTPLT) или SEQ ID NO:364 (QQGYSTPLT).

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 367, 360, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации указанная переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:181, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:181, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:179.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент гуманизован(о) и при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит одну или более обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 5Q, 47I, 48G и 85V, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций, или тем, что указанная переменная область легкой цепи содержит мутацию 78V в соответствии с нумерацией по Kabat.

Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:181, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 359, 360, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:174, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:174, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:179.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 359, 360, 132 и 361, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:174, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:174, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:175, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:175.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 130, 131, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:156, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:156, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:138.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 128, 130, 131, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:134, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:134, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:138.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент гуманизован(о), а переменная область тяжелой цепи содержит одну или более обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 5Q, 47I, 48G и 85V, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций, или переменная область легкой цепи содержит мутацию 78V в соответствии с нумерацией по Kabat.

Также предложено, согласно одному варианту реализации, антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с C-X-C мотивом)-лиганда 13

(CXCL13) человека, отличающееся(ийся) тем, что он(о) может связываться с одним или более остатками аминокислот, выбранными из группы, состоящей из F20, P22, R24 и F25 белка CXCL13.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может связываться с F20 и P22, F20 и R24, F20 и F25, P22 и R24, P22 и F25, или R24 и F25 белка CXCL13. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может связываться с F20, P22 и R24; F20, P22 и F25; F20, R24 и F25; или P22, R24 и F25 белка CXCL13. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может связываться с F20, P22, R24 и F25 белка CXCL13. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может дополнительно связываться с белком CXCL13 яванского макака.

Согласно одному варианту реализации предложено биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть, обладающую специфичностью в отношении белка хемокина (с С-Х-С мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека, и вторую антигенсвязывающую часть, обладающую специфичностью в отношении белка фактора активации В-клеток человека (BAFF), отличающееся тем, что указанная первая антигенсвязывающая часть содержит фрагмент антитела согласно настоящему описанию. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело имеет формат, включающий полное антитело, слитое с двумя одноцепочечными фрагментами (scFv) или с двумя Fab-фрагментами. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вторая часть содержит антигенсвязывающий фрагмент белимумаба.

Также предложены способы и варианты применения. Согласно одному варианту реализации предложен способ подавления иммунного ответа или лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента, или биспецифического антитела согласно настоящему описанию.

Согласно одному варианту реализации предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту указанного антитела или его фрагмента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **фиг. 1** показано, что химерные антитела против CXCL13 обладали высокой активностью при блокировании индуцированного CXCL13 потока кальция в клетках СНО-К1-CXCR5, за исключением 415A3D1.

На **фиг. 2** показано, что антитела против CXCL13, 64C10G1, 21H12D9, 329F2E1, 411A11E9, 71F4A3 и 1H3A11 могли эффективно дозозависимым образом блокировать IP1-сигнал, и эффективность ингибирования была аналогичной.

На **фиг. 3** показано, что антитела против CXCL13 дозозависимым образом ингибировали миграцию клеток BaF3-CXCR5.

На **фиг. 4** показано, что все химерные антитела против CXCL13 ингибировали хемотаксис первичных клеток миндалин человека зависимым от титра образом.

На **фиг. 5** на модели *in vivo* показано, что антитело против CXCL13 64C10G1 обладали высокой эффективностью блокирования – продуцирования антигенспецифического высокоаффинного антитела, переключения классов, что означало ингибирование формирования зародышевого центра.

На **фиг. 6** показано, что моноклональное антитело мыши 424H7F2 было способно дозозависимым образом ингибировать миграцию первичных спленоцитов мыши к CXCL13 мыши.

На **фиг. 7** показано, что антитело мыши против CXCL13 424H7F2 опосредовало ингибирование функции CXCL13 в формировании зародышевого центра (GC) во вторичных лимфоидных органах и переключение классов изотипа необученными В-клетками, и продуцирование антигенспецифического высокоаффинного антитела.

На **фиг. 8** показана идентификация остатков эпитопа на белке CXCL13 человека.

На **фиг. 9** показаны результаты тестирования в анализах последующей сигнализации гуманизированных Fab с мутациями, удаляющими посттрансляционные модификации.

На **фиг. 10** показано, что Fab и 64C10G1-VH1VL2 (D53E, D107E), и 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4) (D54E) могли дозозависимым образом блокировать индуцированную CXCL13 человека миграцию первичных клеток миндалин человека.

На **фиг. 11** показаны связывающие свойства гуманизированных полноразмерных IgG1-антител с мутациями, удаляющими посттрансляционные модификации.

На **фиг. 12** показано, что протестированные антитела ингибировали индуцированную CXCL13 IP1-сигнализацию.

На **фиг. 13** показано, что протестированные антитела с созревшей аффинностью ингибировали индуцированную CXCL13 IP1-сигнализацию.

На **фиг. 14** показано, что протестированные антитела ингибировали миграцию клеток BaF3-CXCR5 (человека) к CXCL13.

На **фиг. 15** показано, что антитела с созревшей аффинностью ингибировали хемотаксис первичных клеток миндалин человека, индуцированный CXCL13, дозозависимым образом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Следует отметить, что объект, обозначаемый термином в единственном числе, относится к одному или более обозначаемым объектам; например, под «антителом» подразумевается одно или более антител. Соответственно, термины в единственном числе, термины «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

В настоящем документе «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфически распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или его одиночную цепь. Соответственно, термин «антитело» включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью, заключающейся в связывании с антигеном. Примеры таких частей включают определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, или ее лиганд-связывающую часть, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную (FR)

область, или любую часть перечисленного, или по меньшей мере одну часть связывающего белка, однако не ограничиваются перечисленным.

Термины «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент», в настоящем документе относятся к части антитела, такой как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и т.п. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознает интактное антитело. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или генетически сконструированный белок, действующий как антитело, путем связывания с конкретным антигеном с образованием комплекса.

«Одноцепочечный вариабельный фрагмент» или « $scFv$ » относится к слитому белку из вариабельных областей тяжелых (V_H) и легких цепей (V_L) иммуноглобулинов. Согласно некоторым аспектам указанные области соединены коротким линкерным пептидом длиной от 10 до приблизительно 25 аминокислот. Указанный линкер может быть обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Указанный белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы $scFv$ известны в данной области техники и описаны, *например*, в патенте США 5892019.

Термин «антитело» охватывает различные широкие классы полипептидов, которые можно различить биохимически. Специалистам в данной области техники будет понятно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), в том числе содержащие некоторые подклассы (*например*, $\gamma 1 - \gamma 4$). Именно природа указанной цепи определяет «класс» антитела: IgG , IgM , IgA , IgG или IgE , соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), *например*, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgG_5 и т.п., хорошо описаны и известно, что они обуславливают функциональную специализацию. Специалист в данной области техники легко определит модифицированные варианты каждого из указанных классов и изотипов в соответствии с настоящим описанием, которые, соответственно, входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом включены в объем настоящего изобретения; приведенное ниже описание, в общем случае, относится к классу молекул иммуноглобулина IgG . В случае IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легких цепей с молекулярной

массой приблизительно 23 000 Да, и два идентичных полипептида тяжелых цепей с молекулярной массой 53 000 – 70 000. Указанные четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурации в виде буквы «Y», где легкие цепи охватывают тяжелые цепи, начинаясь в устье «Y» и проходя вдоль вариабельной области.

Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему описанию включают, без ограничения перечисленным, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические антитела, антитела человека, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, *например*, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), фрагменты, содержащие домен VK или VH, фрагменты, полученные из экспрессионной библиотеки Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, *например*, анти-Id антитела к антителам LIGHT согласно описанию в настоящем документе). Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему описанию могут относиться к любому типу (*например*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

Легкие цепи классифицируют либо как каппа, либо как лямбда (K, λ). Каждый класс тяжелых цепей может быть связан с легкой цепью каппа либо лямбда. В общем случае легкие и тяжелые цепи ковалентно связываются между собой, и «хвостовые» части двух тяжелых цепей соединяются друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями при продуцировании иммуноглобулинов либо гибридами, либо В-клетками, либо генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи последовательности аминокислот идут от N-конца на раздвоенных концах молекулы в Y-конфигурации к C-концу внизу каждой цепи.

И легкие, и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины «константный» и «вариабельный» используют в функциональном смысле. При этом следует понимать, что вариабельные домены частей обоих типов, относящихся к легким (VK) и тяжелым (VH) цепям, определяют распознавание антигенов и специфичность. И напротив, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) обеспечивают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная мобильность, связывание Fc-рецептора, связывание

комплемента и т.п. По принятым правилам нумерация доменов константной области увеличивается по мере отдаления от сайта связывания антигена или аминоконцов антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а в С-концевой части расположена константная область; домены СН3 и СК фактически содержат карбоксильные концы тяжелой и легкой цепей, соответственно.

Как описано выше, вариабельная область позволяет антителу избирательно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть домен VK и домен VH, или подгруппа определяющих комплементарность областей (CDR) антитела комбинируются с образованием вариабельной области, определяющей трехмерный сайт связывания антигена. Указанная четвертичная структура антитела образует сайт связывания антигена, расположенный на конце каждого «плеча» Y. Более конкретно, сайт связывания антигена определен тремя CDR на каждой из цепей VH и VK (*т.е.* CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях *например*, для определенных молекул иммуноглобулина, происходящих из видов верблюдовых или сконструированных на основании иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей, без легких цепей. См., *например*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

Во встречающихся в природе антителах шесть «определяющих комплементарность областей», или «CDR», присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представлены короткими несмежными последовательностями аминокислот, расположенными конкретным образом с образованием антигенсвязывающего домена при принятии антителом его трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые «каркасными» областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные области в значительной степени принимают β -складчатую конформацию, а CDR образуют петли, которые соединяют β -складчатую структуру и в некоторых случаях входят в ее состав. Соответственно, каркасные области работают, образуя скаффолд, который обеспечивает размещение CDR в корректной ориентации за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный размещенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Указанная комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с когнатным эпитопом. Содержащие CDR и каркасные области аминокислоты,

соответственно, могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники для любой заданной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они были точно определены (см. источники: «Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

В случае существования двух или более определений термина, который применяется и/или принят в данной области техники, определение термина в настоящем документе включает все такие значения, если явным образом не указано иное. Конкретным примером является применение термина «определяющая комплементарность область» («CDR») для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, обнаруживаемых в полипептидах вариабельной области как тяжелых, так и легких цепей. Указанная конкретная область была описана в источниках: Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983) и Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылки. Определения CDR по Kabat и Chothia при сравнении включают перекрывающиеся остатки или подгруппы остатков аминокислот. Тем не менее, предполагается, что применение любого определения для CDR антитела или его вариантов входит в объем термина, определенного и используемого в настоящем документе. Подходящие остатки аминокислот, которые охватывают CDR, определенные в соответствии с каждым из упомянутых выше источников, приведены в таблице ниже для сравнения. Точное количество остатков, охватывающих конкретный CDR, варьируют в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут стандартным способом определить, какие остатки содержат конкретный CDR, при известной последовательности аминокислот вариабельной области антитела.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут происходить от любого животного, в том числе птиц и млекопитающих. Предпочтительно, указанные антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно другому варианту реализации указанная вариабельная область может происходить от хрящевых рыб (*например*, от акул).

В настоящем документе термин «константная область тяжелой цепи» включает последовательности аминокислот, происходящие из иммуноглобулина тяжелой цепи.

Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере что-либо одно из: домена СН1, шарнирного домена (*например*, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область), домена СН2, домена СН3, или варианта или фрагмента перечисленного. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения согласно настоящему изобретению может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. Согласно другому варианту реализации полипептид согласно настоящему описанию содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, в антителе для применения согласно настоящему изобретению может отсутствовать по меньшей мере часть домена СН2 (*например*, весь домен или часть домена СН2). Как было сказано выше, специалисту в данной области техники будет понятно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, чтобы она отличалась последовательностью аминокислот от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела, описанные в настоящем документе, может происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. Согласно другому примеру константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. Согласно другому примеру тяжелоцепочечная часть может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG₁ и и частично из молекулы IgG₄.

В настоящем документе термин «константная область легкой цепи» включает последовательности аминокислот, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно, константная область легкой цепи содержит по меньшей мере что-либо одно из константного домена цепи каппа или константного домена цепи лямбда.

«Пара легкая/тяжелая цепь» относится к совокупности легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут формировать димер за счет дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом СН1 тяжелой цепи.

Как было отмечено ранее, субъединичные структуры и трехмерная конфигурация константных областей иммуноглобулинов различных классов хорошо известны. В настоящем документе термин «домен VH» включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин «домен CH1» включает первый домен (расположенный ближе всего к аминоконцу) константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 примыкает к домену VH и располагается в направлении аминоконца от шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

В настоящем документе термин «домен CH2» включает часть молекулы тяжелой цепи, продолжающуюся, *например*, приблизительно от остатка 244 до остатка 360 антитела согласно стандартным схемам нумерации (остатки 244–360, система нумерации Kabat; и остатки 231–340, система нумерации EU; см. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983). Домен CH2 уникален в том смысле, что он близко не спарен с другим доменом. Напротив, две N-связанных разветвленных углеводных цепей расположены между двумя доменами CH2 интактной природной молекулы IgG. Также надежно подтверждено, что домен CH3 продолжается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящем документе термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Указанная шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и обладает гибкостью, таким образом позволяя двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области могут быть подразделены на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161:4083 (1998)).

В настоящем документе термин «дисульфидная связь» включает ковалентную связь, образующуюся между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группы, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и СК соединены дисульфидной связью, а две тяжелых цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 при использовании системы нумерации Kabat (положение 226 или 229 в системе нумерации EU).

В настоящем документе термин «химерное антитело» предусматривает любое антитело, иммунореактивную область или иммунореактивный сайт которого получают, или он(а)

происходит из первого вида, а константную область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим описанием) получают из второго вида. Согласно определенным вариантам реализации связывающие мишень область или сайт происходит из источника, не являющегося человеком (*например*, от мыши или примата), а константная область происходит от человека.

«Специфически связывает» или «обладает специфичностью» обычно означает, что антитело связывается с эпитопом посредством антигенсвязывающего домена, и что указанное связывание подразумевает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с указанным определением говорят, что антитело «специфически связывается» с эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом посредством антигенсвязывающего домена легче, чем могло бы связаться со случайным нерелевантным эпитопом. Термин «специфичность» используют в настоящем документе для качественного определения относительной аффинности, за счет которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, может считаться, что антитело «А» имеет более высокую специфичность в отношении заданного эпитопа, чем антитело «В», или может быть указано, что антитело «А» связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем в отношении родственного эпитопа «D».

В настоящем документе термины «лечить»/«обрабатывать» или «лечение»/ «обработка» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупреждающим мерам, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как прогрессирование рака. Благоприятные или требуемые клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (*т.е.* отсутствие усугубления) статуса заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как детектируемые, так и недетектируемые. «Лечение» может также означать увеличение продолжительности выживания по сравнению с ожидаемым выживанием при отсутствии лечения. Нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже имеется состояние или нарушение, а также подверженных развитию состояния или нарушения, или нуждающихся в предотвращении развития указанного состояния или нарушения.

Под «субъектом», или «индивидуумом», или «животным», или «пациентом», или «млекопитающим» подразумевают любого субъекта, в частности, субъекта-млекопитающее, нуждающееся в диагностике, прогнозе или терапии. Субъекты-млекопитающие включают человека, домашних животных, сельскохозяйственных и зоопарковых животных, животных для спорта или животных-компаньонов, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

В настоящем документе такие выражения, как «нуждающийся в лечении пациент» или «нуждающийся в лечении субъект» включает таких субъектов, как млекопитающие, для которых будет благоприятным введение антитела или композиции согласно настоящему описанию, применяемых, *например*, для детекции, для диагностической процедуры и/или для лечения.

Антитела против CXCL13

Согласно настоящему изобретению предложены антитела, в том числе биспецифические антитела и фрагменты, обладающие специфичностью связывания белка хемокина (с C-X-C-мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека. Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, были получены многочисленные антитела мыши против CXCL13 человека с высокой аффинностью связывания с белком CXCL13 человека. Некоторые из них также способны вступать в перекрестные реакции с белками CXCL13 яванского макака и мыши.

Четыре клона антитела мыши, 21H12D9, 64C10G1, 71F4A3 и 411A11E9, были выбраны для дальнейшей гуманизации и определения характеристик. Гуманизированные антитела сохраняли высокую связывающую активность в отношении белка CXCL13, ингибировали индуцированный CXCL13 поток кальция, блокировали опосредованную CXCL13 IP1-сигнализацию, блокировали обусловленную CXCL13 миграцию клеток, ингибировали продуцирование специфического IgG против KLH, нейтрализовали CXCL13 в периферической крови и блокировали продуцирование В-клеток зародышевого центра (GC), переключение классов и формирование GC. В тестах *in vivo* указанные антитела были способны ингибировать миграцию первичных спленоцитов к CXCL13 и уменьшать популяцию GC В-клеток.

Интересно, что антитела, перекрестно связывающие CXCL13 человека и яванского макака, связывались с одним и тем же эпитопом CXCL13. Указанный эпитоп включал остатки аминокислот F20, P22, R24 и F25 на белке человека.

В соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения предложены антитела и их фрагменты, которые включают переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи с областями CDR антител, полученных в экспериментальных примерах. Указанные CDR обобщены в таблице А ниже.

Таблица А. Последовательности CDR антител мыши

Цепь антитела	Последовательности CDR (CDR1, CDR2, CDR3 по порядку, для VH или VL)	SEQ ID NO:
329F2E1-VH	RYWMS	127
	EINPDSSTINYAPSLKD	128
	QDDYDYYAMDY	191
329F2E1-VL	KASQDVSTGVA	192
	SASYRYT	132
	HQYYTIPLT	193
348B10B1 -VH	EYIMH	194
	GINPDNGDTTYNQKFKG	195
	GVLDY	196
348B10B1 -VL	KSSQSLDSDGKTYLN	197
	LVSCLDS	198
	WQGTFFPFT	199
360A3D4E3 -VH	EYIMH	194
	GIHPDNGDTTYNQKFTG	200
	GVLDY	196
360A3D4E3 -VL	KSSQSLDSDGRTYLN	201
	LVSCLDS	198
	WQGTFFPFT	199
414D10F5 -VH	DYYMA	142
	SISYDGGDSFYRDSVKG	202
	EEDYSGSFPDY	203
414D10F5 -VL	KASQNINKYLN	204
	DTNNLQA	205
	LQHNSLYT	206
339A9E7 -VH	DYAWN	207
	YISYSGDTSYNPSLRS	208
	GHFDY	209
339A9E7 -VL	KSSQSLDSDGETYLN	210
	LVSCLDS	198
	WQGTFFPYT	211

339H3E2 -VH	EYIMH	194
	GINPNNGGTTYNQKFKG	212
	GVMDY	213
339H3E2 -VL	KSSQSLDSDGKTYLN	197
	LVSKLDS	198
	WQGTTHFPFT	199
367F1C2 -VH	DYAWN	207
	YISYTGSSSYNPSLKS	214
	GHFDY	209
367F1C2 -VL	KSSQSLDSDGKTYLN	197
	QVSKLDS	215
	WQGTTHFPYT	211
21H12D9 -VH	DYYMN	97
	VINPNNGGTTYKEKFKG	98
	DDYDAGY	99
21H12D9 -VL	KASQNVDTAVA	100
	SASHRYT	101
	QQYTDFPLT	102
408E3F3 -VH	TSAMVVS	216
	AIDWEGDKYYNPSLES	217
	MSSADSHSVLDA	218
408E3F3 -VL	KASQNIHNYLN	219
	NTNNLQT	220
	LQHSSSLT	221
415A3D1F4 -VH	DFYIN	222
	FMRNKANGYTTEYNPSVKG	223
	SRYNADDYYVGVMDV	224
415A3D1F4 -VL	LASEDIYNNLA	225
	YTNSLQD	226
	LQDSEYPWT	227
348E12F12 -VH	SDYAWN	228
	YISYSGDTSYNPSLKS	229
	GHFDY	209
348E12F12 -VL	KSSQSLDSDGKTYLN	197
	LVSNLDS	230
	WQGTTHFPYT	211
368D6D10 -VH	SDYAWN	228
	YISYSGSTSYNPSLKS	231
	GHFDY	209
368D6D10 -VL	KSSQSLDSDGKTYLN	197
	LVSKLDS	198
	WQGTTHFPYT	211
IH3A11 -VH	SYAMS	112
	TISDGGSDTYYPDNVKG	232

	DYYGSSYEDYAMDY	233
1H3A11 -VL	KASQDINKYIT	234
	YTSTLQP	118
	LQYDNLYT	119
355A1F6 -VH	SDYAWS	235
	YISYSDSTSYNPSLKS	236
	GHFDY	209
355A1F6 -VL	KSSQSLLSDGKTYLN	197
	LVSKLDS	198
	WQGTTHFPYT	211
353F9C4-VH	SDYAWS	235
	YITYSDSTSYNPSLKS	237
	GHFDY	209
353F9C4-VL	KSSQSLLSDGKTYLN	197
	LVSKLDS	198
	WQGTTHFPYT	211
19H7E10-VH	DYYMN	97
	DINPNNDGTTYNQKFKD	238
	LSWSFFAMDY	239
19H7E10-VL	KASQDVSSGVA	240
	SASHRHT	241
	QQYYNTPWT	242
411A11E9-VH	DYYMA	142
	SINYDGGDTYYRDSVKG	143
	EEDYDGSYVMDA	144
411A11E9-VL	KASQNINKELT	145
	NTNILQT	146
	LQQSSLYT	147
64C10G1-VH	SYAMS	112
	TISDGGSDAYYPDNVKG	113
	DYYGSGYEDSPMDY	115
64C10G1-VL	KASQDINKYIA	117
	YTSTLQP	118
	LQYDNLYT	119
397C3B3-VH	SDYAWN	228
	YISYSGSTSYNPSLKS	231
	GHFDY	209
397C3B3-VL	KSSQSLLSDGKTYLN	197
	LVSKLDS	198
	WQGTTHFPYT	211
71F4A3-VH	RYWMS	127
	EINPDSSTINYAPSLKD	128
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VL	KASQDVNTGVA	131

	SASYRYT	132
	QYYSTPLT	133
119H10D6-VH	TYWIE	243
	EILPGSESTDYNEKFKD	244
	DYYGYFDY	245
119H10D6-VL	KASQDVSTAVV	246
	SASYRYT	132
	QQHYSSPRT	247
130D6G1-VH	TYWIE	243
	EILPGSDSTNSNEKFEG	248
	DYYGFYFDY	249
130D6G1-VL	KASQDVSTAVA	250
	STSYRYT	251
	QQHYTTPRT	252
156H3H7 -VH	DYYMN	97
	DINPNNGDTTYNQKFKG	253
	YDEDHYAMDY	254
156H3H7 -VL	KASQDVSTGVA	192
	SASHRYT	101
	QYYTTPWT	255
168A2D4-VH	DYYMN	97
	DINPNNGDIIYNQKFKG	256
	YYDPYYHAMDY	257
168A2D4-VL	KASQDVSTGVA	192
	SASYRYT	132
	QQQYSVPLT	258
168D6F2-VH	SYWMH	259
	GIDPDGATKDNEKFKT	260
	GSTVVAPGDYFAMDY	261
168D6F2-VL	RASESVDNYGISFMH	262
	RASNLD	263
	QQSNKDPWT	264
175E3B10-VH	VFGMGVG	265
	HIWDDDEKYYPALKS	266
	IDGYYDFDY	267
175E3B10-VL	RSSHIVQDNGNTYLQ	268
	KVSNRFS	269
	FQGSYVPYT	270
177D2G10-VH	TSGMHVG	271
	HIYWDDDKRYNPSLKS	272
	RGGDYDYDEGFDY	273
177D2G10-VL	RSSQSLVHSGFTYLH	274
	KVSNRFS	269
	SQSTHVPYT	275

178B2E8-VH	TDYYMT	276
	NINYDGSRTNYLDSLKS	277
	DGNYHFGMDY	278
178B2E8-VL	KASQDVSTAVA	250
	WASTRHT	279
	QQHYSTPWT	280
178E2B3-VH	NHLIE	281
	VINPGSGGTKYNEKFKG	282
	SSDGYEEDYFDY	283
178E2B3-VL	SASSSVNYMQ	284
	DTSELAS	285
	QQWSSDPIT	286
181B11G12-VH	DYYMA	142
	NINYDGSPTYLDSLKS	287
	DVAYDDSYAMDY	288
181B11G12-VL	KASQDINKYIA	117
	YTSTLQP	118
	LQYDSLTY	289
184H10B5-VH	VFGMGVG	265
	HIWWDDEKYYPALKS	266
	IDGYDFDY	267
184H10B5-VL	RSSHIVQDNGNTYLQ	268
	KVSNRFS	269
	FQGSYVPYT	270
345G1B4-VH	TSNMGVG	290
	HIWDDVKRYNPALKS	291
	STTLVAFDY	292
345G1B4-VL	KSSQSLLNSGNQKNYLT	293
	WASTRES	294
	QNDYSYPT	295
396A5A1-VH	TSGMGIG	296
	HIWDDIKRYNPALKS	297
	STTVVAFDY	298
396A5A1-VL	KSSQSLLNSGNQKNYLT	293
	WASTRES	294
	QNDYDYPT	299
402H2G12-VH	TYGMGVG	300
	NIWDDDKYYPQLQN	301
	SELIMPYPFDY	302
402H2G12-VL	QASQDIDNHLI	303
	YATNLAN	304
	LQFKQYPFT	305
409G9C2-VH	SSYWT	306
	IYHSGRP	307

	TAAVSYWYFDL	308
409G9C2-VL	QASQDIGNDLI	309
	YASNLAN	310
	LQFKQYPFT	305
410A4D10-VH	SRNWWG	311
	IYHSGGT	312
	EFGDSVWYFDL	313
410A4D10-VL	QASQDIGNDLV	314
	YATNLAD	315
	LQFKQYPYT	316
414G3F4-VH	SSYWWI	317
	IYHSGRP	307
	EAGDSVWYFDL	318
414G3F4-VL	QASQDIGNELI	319
	YATSLAD	320
	LQFKQYPFT	305
416C9H8-VH	PYGMGVG	321
	NIWWDDDKYYNPSLIN	322
	SELVMPYVPFDY	323
416C9H8-VL	QASQDIENDLV	324
	YATNLAN	304
	LQFKQYPYT	316
418D3H6-VH	TYGMGVG	300
	NIWWDDDKYYNPSLIN	322
	SELVMPYVPFDF	325
418D3H6-VL	QASQDIGIELI	326
	YTANLAS	327
	LQYKQYPFT	328
423A6H6-VH	TYGMGVG	300
	NIWWDDDKYYNPSLQN	301
	SELIMPYVPFDY	302
423A6H6-VL	QASQDIDNHLI	303
	YATNLAN	304
	LQFKQYPFT	305
424H7F2-VH	PYGMGVG	321
	NIWWDDDKYYNPSLIN	322
	SELVMPYVPFDY	323
424H7F2-VL	QASQDIENDLI	329
	YATNLAN	304
	LQFKQYPYT	316
427C4F11-VH	TYGMGVG	300
	NIWWDDDKYSNPSLQS	330
	SELVMPYVPFDY	323
427C4F11-VL	QASQDIDNHLI	303

	YATNLAN	304
	LQFKQYPFT	305
430D9B3-VH	PYGMGVG	321
	NIWWDDDKYYNPSLIN	322
	SELVMPYVPFDY	323
430D9B3-VL	QASQDIENDLI	329
	YATNLAN	304
	LQFKQYPYT	316
432C12E1-VH	TYGMGVG	300
	NIWWDDDKYYNPSLKN	331
	SEIVMPYVPFDY	332
432C12E1-VL	QASQDIGNDLI	309
	YATNLAN	304
	LQFKQYPFT	305
442C9H4 -VH	TYGMGVG	300
	NIWWDDDKYYNPSLIN	322
	SELVMPYVPFDF	325
442C9H4 -VL	QASQDIGIDLI	333
	YTANLAS	327
	LQYKQYPFT	328
445A6G7-VH	PYGMGVG	321
	NIWWDDDKYYNPSLIN	322
	SELVMPYVPFDY	323
445A6G7-VL	QASQDIGNDLI	309
	YATNLAN	304
	LQFKQYPYT	316
537C8D7-VH	DYAMA	334
	TVFYDGSDTFYRDSVKG	335
	EGDYYSRHHVYVGYNWFPH	336
537C8D7-VL	LTSEDINSELA	337
	NANSLQD	338
	QQYNSYPLT	339

Согласно некоторым вариантам реализации указанные CDR1, CDR2 и CDR3 VH выбирают из любого набора CDR1, CDR2 и CDR3 VH, приведенных в таблице А, а CDR1, CDR2 и CDR3 VL выбирают из любого набора CDR1, CDR2 и CDR3 VL, приведенных в таблице А. Согласно некоторым вариантам реализации указанные CDR1, CDR2 и CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL выбирают из происходящих из одного и того же антитела в примерах.

Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна, или две, или три, или четыре, или пять, или шесть из вышеперечисленных областей CDR1, CDR2 и CDR3 VH

и CDR1, CDR2 и CDR3 VL модифицированы путем одного (одной), двух или трех добавлений, делеций, замен аминокислот или комбинаций перечисленного.

Согласно одному варианту реализации указанное антитело против CXCL13 или его фрагмент включает следующие области CDR: HCDR1: DYYMN (SEQ ID NO: 97), HCDR2: VINPNNGGTTYKEKFKG (SEQ ID NO: 98), HCDR3: DDYDAGY (SEQ ID NO: 99), LCDR1: KASQNVDTAVA (SEQ ID NO: 100), LCDR2: SASHRYT (SEQ ID NO: 101) и LCDR3: QQYTDFPLT (SEQ ID NO: 102).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более из следующих обратных мутаций в тяжелой цепи: 12V, 20M, 48I, 68A, 70L, 72V, 77G и 112L, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более из следующих обратных мутаций в легкой цепи: 13T и 78V в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинации.

Неограничивающие примеры переменных областей тяжелых цепей включают SEQ ID NO: 95 и 103–106. Неограничивающие примеры переменных областей легких цепей включают SEQ ID NO: 96 и 107–109.

Согласно одному варианту реализации указанное антитело против CXCL13 или его фрагмент включает следующие области CDR: HCDR1: SYAMS (SEQ ID NO: 112), HCDR2: TISDGGSDAYYPDNVKG (SEQ ID NO: C2), HCDR3: DYYGSGYEDSPMDY (SEQ ID NO: 115), LCDR1: KASQDINKYIA (SEQ ID NO: 117), LCDR2: YTSTLQP (SEQ ID NO: 118) и LCDR3: LQYDNLYT (SEQ ID NO: 119).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более из следующих обратных мутаций в легкой цепи: 49H, 58I, 71Y и 83F в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинации.

Неограничивающие примеры переменных областей тяжелых цепей включают SEQ ID NO: 110 и 120. Неограничивающие примеры переменных областей легких цепей включают SEQ ID NO: 111 и 121–124.

Согласно одному варианту реализации один или более остатков аминокислот в областях CDR заменяют на другую аминокислоту, чтобы избежать посттрансляционной

модификации. Пример антитела против CXCL13 или его фрагмента включает следующие области CDR: HCDR1: SYAMS (SEQ ID NO: 112), HCDR2: TISEGGSDAYYPDNVKG (SEQ ID NO:114), HCDR3: DYYGSGYEESPMDY (SEQ ID NO:116), LCDR1: KASQDINKYIA (SEQ ID NO: 117), LCDR2: YTSTLQP (SEQ ID NO: 118) и LCDR3: LQYDONLYT (SEQ ID NO: 119).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более из следующих обратных мутаций в легкой цепи: 49H, 58I, 71Y и 83F в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинации.

Неограничивающие примеры переменных областей тяжелых цепей включают SEQ ID NO: 157. Неограничивающие примеры переменных областей легких цепей включают SEQ ID NO: 111 и 121–124, в частности, SEQ ID NO:121.

Согласно одному варианту реализации указанное антитело против CXCL13 или его фрагмент включает следующие области CDR: HCDR1: RYWMS (SEQ ID NO: 127), HCDR2: EINPDSSTINYAPSLKD (SEQ ID NO: 128), HCDR3: QDDYEYYAMDY (SEQ ID NO: 130), LCDR1: KASQDVNTGVA (SEQ ID NO: 131), LCDR2: SASRYT (SEQ ID NO: 132) и LCDR3: QQYYSTPLT (SEQ ID NO: 133).

Согласно одному варианту реализации один или более остатков аминокислот в областях CDR заменяют на другую аминокислоту, чтобы избежать посттрансляционной модификации. Пример антитела против CXCL13 или его фрагмент включает следующие области CDR: HCDR1: RYWMS (SEQ ID NO: 127), HCDR2: EINPESSTINYAPSLKD (SEQ ID NO:129), HCDR3: QDDYEYYAMDY (SEQ ID NO: 130), LCDR1: KASQDVNTGVA (SEQ ID NO: 131), LCDR2: SASRYT (SEQ ID NO: 132) и LCDR3: QQYYSTPLT (SEQ ID NO: 133).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более из следующих обратных мутаций в тяжелой цепи: 5Q, 47I, 48G и 85V в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более следующих обратных мутаций в легкой цепи: 78V в соответствии с нумерацией по Kabat.

Неограничивающие примеры переменных областей тяжелых цепей включают SEQ ID NO: 125 и 134–137. Неограничивающие примеры переменных областей легких цепей включают SEQ ID NO: 126 и 138–139.

После гуманизации антитело 71F4A3 дополнительно проходило через раунды аффинного созревания. Последовательности CDR из различных вариантов 71F4A3 приведены в **таблице В** и обобщены в **таблице С** ниже.

Таблица В. Антитела, происходящие из 71F4A3, и их CDR

Цепь антитела (SEQ ID NO:)	Последовательности CDR (CDR1, CDR2, CDR3)	SEQ ID NO:
71F4A3-VH (125)	RYWMS	127
	EINPDSSTINYAPSLKD	128
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VL (126)	KASQDVNTGVA	131
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-VH1 (134)	RYWMS	127
	EINPDSSTINYAPSLKD	128
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VH2 (135)	RYWMS	127
	EINPDSSTINYAPSLKD	128
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VH3 (136)	RYWMS	127
	EINPDSSTINYAPSLKD	128
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VH4 (137)	RYWMS	127
	EINPDSSTINYAPSLKD	128
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VL1 (138)	KASQDVNTGVA	131
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-VL2 (139)	KASQDVNTGVA	131
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-VH (D54E) (156)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VL (138)	KASQDVNTGVA	131
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-BC1-VH (158)	RYWMS	127
	EINPEASSINYAPSLKD	340
	QDDYSHYAMDY	341
71F4A3-BC1-VL (159)	KASQDVNTGVS	342
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-BC4-VH (160)	RYWMS	127
	EINPEAGKWNYPAPSLKD	343
	QDDYTTYAMDY	344
71F4A3-BC4-VL (161)	KASQDVNTGVS	342
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-BE3-VH (162)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYLTYYAMDY	345
71F4A3-BE3-VL (163)	KASQDVNTAVD	346

	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-BD12-VH (164)	RYWMS	127
	EINPETTIINYAPSLKD	347
	QDDYRHYAMDY	348
71F4A3-BD12-VL (165)	KASQDVNTGVA	131
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-4H1-VH (166)	RYWMS	127
	EINPESTLINYAPSLKD	349
	QDDYRNYAMDY	350
71F4A3-4H1-VL (167)	KASQDVNTGVS	342
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-5A4-VH (168)	RYWMS	127
	EINPESTGINYAPSLKD	351
	QDDYWTYAMDY	352
71F4A3-5A4-VL (169)	KASQDVNTAVS	353
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-3F12-VH (170)	RYWMS	127
	EINPESNFINYAPSLKD	354
	QDDYSVYAMDY	355
71F4A3-3F12-VL (171)	KASQDVNTGVT	356
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-B12-VH (172)	RYWMS	127
	EINPERNYINYAPSLKD	357
	QDDYDKYAMDY	358
71F4A3-B12-VL (173)	KASQDVNTGVT	356
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4A3-VH (D54E) (156)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYEYYAMDY	130
71F4A3-VL (138)	KASQDVNTGVA	131
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
005-3-18-VH (174)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYEYYTMDY	359
005-3-18-VL (175)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYWSTPLT	361
005-3-23-VH (176)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QEDYEYYALDY	362
005-3-23-VL (177)	KASQDVNTGVY	363
	SASYRYT	132
	QQGYSTPLT	364
005-2-45-VH (178)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDTRYAMDY	365
005-2-45-VL (138)	KASQDVNTGVA	131
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-VH (174)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYEYYTMDY	359
71F4-B-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-L-VH (180)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129

	QDDYLYYTMDY	366
71F4-B-L-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-T-VH (181)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYETYTMDY	367
71F4-B-T-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-LT-VH (182)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYLYYTMDY	368
71F4-B-LT-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-A-VH (183)	RYWMS	127
	EINPEASTINYAPSLKD	369
	QDDYEYYTMDY	359
71F4-B-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-S1-VH (184)	RYWMS	127
	EINPESSSINYAPSLKD	370
	QDDYEYYTMDY	359
71F4-B-S1-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-S2-VH (185)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYSYYTMDY	371
71F4-B-S2-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-H-VH (186)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYEHYTMDY	372
71F4-B-H-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-SH-VH (187)	RYWMS	127
	EINPESSTINYAPSLKD	129
	QDDYSHYTMDY	373
71F4-B-SH-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-AS-VH (188)	RYWMS	127
	EINPEASSINYAPSLKD	340
	QDDYEYYTMDY	359
71F4-B-AS-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-SSH-VH (189)	RYWMS	127
	EINPESSSINYAPSLKD	370
	QDDYSHYTMDY	373
71F4-B-SSH-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133
71F4-B-ASH-VH (190)	RYWMS	127
	EINPEASSINYAPSLKD	340
	QDDYSHYTMDY	373
71F4-B-ASH-VL (179)	KVSQDVNTGVA	360
	SASYRYT	132
	QQYYSTPLT	133

Таблица С. Обзор CDR антител, происходящих из 71F4A3

CDR	Последовательность (SEQ ID NO:)
CDRH1	RYWMS (127)
CDRH2	EINPDSSTINYAPSLKD (128) EINPESSSTINYAPSLKD (129) EINPEASSINYAPSLKD (340) EINPEAGKWNYPAPSLKD (343) EINPETTIINYAPSLKD (347) EINPESTLINYPAPSLKD (349) EINPESTGINYPAPSLKD (351) EINPESNFINYAPSLKD (354) EINPERNYINYAPSLKD (357) EINPEASTINYAPSLKD (369) EINPESSSINYAPSLKD (370)
CDRH3	QDDYEYYAMDY (130) QDDYSHYAMDY (341) QDDYTTYAMDY (344) QDDYLYTYAMDY (345) QDDYRHYAMDY (348) QDDYRNYAMDY (350) QDDYWTYAMDY (352) QDDYSVYAMDY (355) QDDYDKYAMDY (358) QDDYEYYTMDY (359) QEDYEYYALDY (362) QDDTRYAMDY (365) QDDYLYYTMDY (366) QDDYETYTMDY (367) QDDYLYTYTMDY (368) QDDYSYYTMDY (371) QDDYEHYTMDY (372) QDDYSHYTMDY (373)
CDRL1	KASQDVNTGVA (131) KASQDVNTGVS (342) KASQDVNTAVD (346) KASQDVNTAVS (353) KASQDVNTGVT (356) KVSQDVNTGVA (360) KASQDVNTGVY (363)
CDRL2	SASYRYT (132)
CDRL3	QQYYSTPLT (133) QQYWSTPLT (361) QQGYSTPLT (364)

Согласно одному варианту реализации предложено антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с С-Х-С мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека, которое (который) содержит последовательности CDR, перечисленные в таблице В или таблице С.

Согласно одному варианту реализации предложено антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с С-Х-С мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека, которое (который) содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2

и HCDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где: указанная HCDR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:127 (RYWMS); указанная HCDR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:128 (EINPDSSTINYAPSLKD), SEQ ID NO:129 (EINPESSTINYAPSLKD), SEQ ID NO:340 (EINPEASSINYAPSLKD), SEQ ID NO:343, (EINPEAGKWNYPALSLKD), SEQ ID NO:347 (EINPETTIINYAPSLKD), SEQ ID NO:349 (EINPESTLINYPALSLKD), SEQ ID NO:351, INPESTGINYPALSLKD), SEQ ID NO:354 (EINPESNFINYAPSLKD), SEQ ID NO:357 (EINPERNYINYAPSLKD), SEQ ID NO:369 (EINPEASTINYAPSLKD) или SEQ ID NO:370 (EINPESSSINYAPSLKD); указанная HCDR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:130 (QDDYEYYAMDY), SEQ ID NO:341 (QDDYSHYAMDY), SEQ ID NO:344 (QDDYTTYAMDY), SEQ ID NO:345 (QDDYLTYYAMDY), SEQ ID NO:348 (QDDYRHYAMDY), SEQ ID NO:350 (QDDYRNYAMDY), SEQ ID NO:352 (QDDYWTYYAMDY), SEQ ID NO:355 (QDDYSVYYAMDY), SEQ ID NO:358 (QDDYDKYYAMDY), SEQ ID NO:359 (QDDYEYYTMDY), SEQ ID NO:362 (QEDYEYYALDY), SEQ ID NO:365 (QDDTRYYYAMDY), SEQ ID NO:366 (QDDYLYYTMDY), SEQ ID NO:367 (QDDYETYTMDY), SEQ ID NO:368 (QDDYLTYYTMDY), SEQ ID NO:371 (QDDYSYYTMDY), SEQ ID NO:372 (QDDYEHYTMDY) или SEQ ID NO:373 (QDDYSHYTMDY); указанная LCDR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:131 (KASQDVNTGVA), SEQ ID NO:342 (KASQDVNTGVS), SEQ ID NO:346 (KASQDVNTAVD), SEQ ID NO:353 (KASQDVNTAVS), SEQ ID NO:356 (KASQDVNTGVT), SEQ ID NO:360 (KVSQDVNTGVA) или SEQ ID NO:363 (KASQDVNTGVY); указанная LCDR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:132 (SASYRYT); и указанная LCDR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:133 (QQYYSTPLT), SEQ ID NO:361 (QQYWSTPLT) или SEQ ID NO:364 (QQGYSTPLT).

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 367, 360, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:181, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:181, а переменная область легкой цепи содержит

последовательность аминокислот SEQ ID NO:179, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:179.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или фрагмент гуманизирован(о) и отличается тем, что переменная область тяжелой цепи содержит одну или более обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 5Q, 47I, 48G и 85V, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций, или тем, что переменная область легкой цепи содержит мутацию 78V в соответствии с нумерацией по Kabat.

Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:181, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179.

6 Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 359, 360, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:174, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:174, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:179.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 359, 360, 132 и 361, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:174, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:174, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:175, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:175.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 130, 131, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:156, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную

последовательности SEQ ID NO:156, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:138.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 128, 130, 131, 132 и 133, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:134, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:134, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:138.

Согласно одному варианту реализации указанное антитело против CXCL13 или его фрагмент включает следующие области CDR: HCDR1: DYYMA (SEQ ID NO: 142), HCDR2: SINYDGGDTYYRDSVKG (SEQ ID NO: 143), HCDR3: EEDYDGSYVMDA (SEQ ID NO: 144), LCDR1: KASQNINKELT (SEQ ID NO: 145), LCDR2: NTNILQT (SEQ ID NO: 146) и LCDR3: LQQSSLYT (SEQ ID NO: 147).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более из следующих обратных мутаций в тяжелой цепи: 24V, 70V, 98T и 105A в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело гуманизировано, но содержит одну или более из следующих обратных мутаций в легкой цепи: 58I, 71Y и 87F в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинации.

Неограничивающие примеры переменных областей тяжелых цепей включают SEQ ID NO: 140 и 148–151. Неограничивающие примеры переменных областей легких цепей включают SEQ ID NO: 141 и 152–155.

Интересным открытием было то, что антитела, перекрестно связывающие белки CXCL13 как человека, так и яванского макака, нацелены на эпитоп, отличный от эпитопов известных антител против CXCL13. Соответственно, согласно одному варианту реализации предложено антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с C-X-C мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека,

отличающееся(ийся) тем, что он(о) может связываться с одним или более остатками аминокислот, выбранными из группы, состоящей из F20, P22, R24 и F25 белка CXCL13.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может связываться с F20 и P22, F20 и R24, F20 и F25, P22 и R24, P22 и F25, или R24 и F25 белка CXCL13. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может связываться с F20, P22 и R24; F20, P22 и F25; F20, R24 и F25; или P22, R24 и F25 белка CXCL13.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может связываться с F20, P22, R24 и F25 белка CXCL13. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его фрагмент может дополнительно связываться с белком CXCL13 яванского макака.

Области CDR, переменные области тяжелых цепей и переменные области легких цепей согласно настоящему описанию могут быть дополнительно модифицированы. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированная переменная область тяжелой цепи или переменная область легкой цепи сохраняет по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательностей и все еще способна к связыванию с CXCL13.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная модификация заключается в замене не более чем в одном положении – «горячей точке» в каждой из CDR. Согласно некоторым вариантам реализации указанная модификация заключается в замене в одном, двух или трех таких положениях – «горячих точках». Согласно одному варианту реализации указанная модификация заключается в замене в одном из положений – «горячих точек». Такие замены, согласно некоторым вариантам реализации, представляют собой консервативные замены.

«Консервативная замена аминокислоты» представляет собой замену, при которой остаток аминокислоты заменяют на остаток аминокислоты, имеющей аналогичную боковую цепь. В данной области техники были определены семейства остатков аминокислот, имеющих аналогичные боковые цепи, в том числе основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные

боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Соответственно, остаток заменимой аминокислоты в иммуноглобулиновом полипептиде предпочтительно заменяют на другой остаток аминокислоты из того же семейства боковых цепей. Согласно другому варианту реализации цепочка аминокислот может быть заменена на структурно аналогичную цепочку, отличающуюся порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

Неограничивающие примеры консервативных замен аминокислот приведены в таблице ниже, где показатель сходства, равный 0 или выше указывает на консервативную замену для двух аминокислот.

Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Консервативные замены аминокислот

Заменяемая аминокислота	Замена на:
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Специалисту в данной области техники также будет понятно, что антитела, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы таким образом, что их последовательность аминокислот отличается от последовательности встречающегося в природе связывающего полипептида, от которого они происходят. Например, полипептид или последовательность аминокислот, происходящие из заданного белка, могут быть аналогичными, *например*, характеризоваться определенным процентом идентичности стартовой последовательности, *например*, могут быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичны стартовой последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит последовательность аминокислот или один или более фрагментов, обычно не ассоциированных с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно настоящему описанию может содержать гибкую линкерную последовательность, или может быть модифицировано с добавлением

функционального фрагмента (*например*, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки).

Антитела, их варианты или производные согласно настоящему описанию включают модифицированные производные, *т.е.* модифицированные путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, чтобы ковалентное присоединение не предотвращало связывание антитела с эпитопом. Например, но без ограничения, антитела могут быть модифицированы, *например*, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.п. Любая из многочисленных химических модификаций может быть выполнена с помощью известных методик, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, специфического химического расщепления, ацетилирования, формилирования, метаболического синтеза туникамицина и т.п. Кроме того, указанные антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического отклика, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Антитела могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, улучшающий ультразвуковую визуализацию агент, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие такие агенты, известные в данной области техники.

Бифункциональные молекулы

Также предложены бифункциональные молекулы, такие как биспецифические антитела. Согласно одному варианту реализации указанная бифункциональная молекула обладает специфичностью первого типа в отношении CXCL13, а также специфичностью второго

типа. Специфичность второго типа, согласно одному варианту реализации, направлена на другой цитокин или на иммунную клетку.

Например, активирующий В-клетки фактор (BAFF), также известный как лиганд – представитель 13В суперсемейства факторов некроза опухоли, представляет собой цитокин, принадлежащий к семейству лигандов – факторов некроза опухоли (ФНО). Указанный цитокин представляет собой лиганд рецепторов TNFRSF13B/TACI, TNFRSF17/BCMA и TNFRSF13C/BAFF-R. Указанный цитокин экспрессируется в клетках В-клеточной линии, и действует как мощный активатор В-клеток. Было также показано, что он играет важную роль в пролиферации и дифференцировке В-клеток. Источником специфичности, направленной против BAFF, может быть антитело против BAFF, такое как белимумаб.

Согласно другому примеру специфичность второго типа может быть направлена на ИФН- α -RI (альфа-цепь рецептора интерферона-альфа/бета, или IFNAR1). ИФН (интерфероны) типа I, в частности, ИФН- α s и ИФН- β , привлекали внимание из-за их роли в патогенезе аутоиммунных и воспалительных синдромов. За счет сигнализации через общий рецептор (IFNAR) указанные плеiotропные цитокины влияют практически на все аспекты врожденного и адаптивного иммунного ответа, в том числе на положительную регуляцию МНС и костимулирующих молекул, и продуцирование факторов выживания В-клеток (BAFF, *Apri*l) антигенпрезентирующими клетками, что заканчивается привлечением и размножением аутореактивных Т- и В-клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага, нейтрофила, дендритной клетки, фагоцита, естественной клетки-киллера, эозинофила, базофила и тучной клетки. Молекулы на иммунной клетке, которая может быть мишенью, включают, например, CD3, CD16, CD19, CD28 и CD64. Другие примеры включают PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известный как CD137), TIM3, OX-40 или OX40L, CD40 или CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272), иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток (KIR) и CD47.

Направленная против CXCL13 специфичность может также быть скомбинирована со специфичностью в отношении опухолевого антигена. «Опухолевый антиген»

представляет собой антигенное вещество, продуцируемое в опухолевых клетках, *т.е.* оно запускает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены подходят для идентификации опухолевых клеток и являются потенциальными кандидатами для применения в противораковой терапии. Нормальные белки в организме не являются антигенными. Определенные белки, однако, продуцируются или сверхэкспрессируются при туморогенезе и, соответственно, кажутся организму «чужеродными». Указанные белки могут включать нормальные белки, хорошо секвестрированные от иммунной системы, белки, в норме продуцируемые в крайне незначительных количествах, белки, в норме продуцируемые только на определенных стадиях развития, или белки, структура которых модифицирована в результате мутации.

В данной области техники известно множество опухолевых антигенов, и новые опухолевые антигены могут быть легко идентифицированы с помощью скрининга. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают рЭФР, Her2, EpCAM, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, CD73, CEA, gpA33, муцины, TAG-72, CIX, PSMA, связывающий фолаты белок, GD2, GD3, GM2, ФРЭС, VEGFR, интегрин, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EphA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP и тенасцин.

Также предложен другой формат биспецифических антител. Согласно некоторым вариантам реализации каждый из фрагментов – направленный против CXCL13 фрагмент и второй фрагмент – независимо выбран из Fab-фрагмента, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело дополнительно включает Fc-фрагмент.

Полинуклеотиды, кодирующие указанные антитела и способы получения указанных антител

Согласно настоящему изобретению также предложены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие указанные антитела, их варианты или производные согласно настоящему описанию. Полинуклеотиды согласно настоящему описанию могут кодировать целые переменные области тяжелых и легких цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того,

полинуклеотиды согласно настоящему описанию могут кодировать части переменных областей тяжелых и легких цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации и переменные, и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему описанию являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с применением методик, описанных в данной области техники и в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против конкретного антигена могут быть получены путем введения указанного антигена модифицированному для продуцирования таких антител в ответ на антигенную стимуляцию трансгенному животному, эндогенные локусы у которого были лишены функциональности. Примеры методик, которые могут применяться для получения таких антител, описаны в патентах США: 6150584; 6458592; 6420140, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Способы лечения и диагностики

Согласно описанию в настоящем документе антитела, варианты или производные согласно настоящему описанию могут применяться в определенных способах лечения и диагностики.

Также настоящее изобретение относится к терапии на основе антител, которая включает введение антител согласно настоящему описанию пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более нарушений или состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно настоящему описанию включают, не ограничиваясь перечисленными, антитела согласно настоящему описанию (в том числе их варианты и производные согласно описанию в настоящем документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно настоящему описанию (в том числе их варианты и производные согласно описанию в настоящем документе).

Согласно одному варианту реализации предложен способ подавления иммунного ответа у нуждающегося в этом пациента. Указанный способ подразумевает введение указанному пациенту антитела, фрагмента или бифункциональной молекулы согласно настоящему описанию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный пациент представляет собой реципиента трансплантата ткани или органа.

Согласно некоторым вариантам реализации предложен способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения. Неограничивающие примеры аутоиммунного заболевания или нарушения включают диабет I типа, ревматоидный артрит (РА), псориаз/псориатический артрит, рассеянный склероз, системную красную волчанку (волчанку), воспалительное заболевание кишечника, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, тяжелую миастению, васкулит, пернициозную анемию и целиакию.

Антитела согласно настоящему описанию могут также применяться для лечения или ингибирования рака. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Указанный способ, согласно одному варианту реализации, предусматривает введение указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему описанию. Неограничивающие примеры рака включают рак мочевого пузыря, рак печени, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак эндометрия, лейкоз, лимфому, рак поджелудочной железы, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак уретры, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, рак пищевода, рак яичников, рак почек, меланому, рак предстательной железы и рак щитовидной железы.

Дополнительные заболевания или состояния, ассоциированные с повышенным выживанием клеток, лечение, предотвращение, диагностика и/или прогнозирование которых может проводиться с применением антител или их вариантов, или их производных согласно настоящему описанию, включают, не ограничиваясь перечисленным, прогрессирование и/или метастазы злокачественных новообразований и связанные с ними нарушения, такие как лейкоз (в том числе острые лейкозы (*например*, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (в том числе миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (*например*, хронический миелоцитарный

(гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), истинная полицитемия, лимфомы (*например*, болезнь Ходжкина и неходжкинскую лимфому), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак эндометрия, меланому, рак предстательной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточный рак, гепатому, карциному желчного протока, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую невриному, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому и ретинобластому.

Конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента зависит от различных факторов, в том числе конкретных используемых антител, их вариантов или производных, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона пациента, а также времени введения, скорости выведения, комбинируемых лекарственных средств и тяжести конкретного заболевания, лечение которого проводят. Рассмотрение таких факторов лечащими медицинскими специалистами входит в обычную квалификацию в данной области техники. Количество также зависит от индивидуального пациента, подлежащего лечению, маршрута введения, типа состава, характеристик применяемого соединения, тяжести заболевания и требуемого эффекта. Количество для применения может быть определено на основании принципов фармакологии и фармакокинетики, хорошо известных в данной области техники.

Способы введения антител или их вариантов включают, не ограничиваясь перечисленными, внутрисуставный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный маршруты введения. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции могут вводиться с использованием любого удобного маршрута, например, путем инфузии или болюсной инъекции, абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (*например*, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника, и т.п.), и могут вводиться совместно с другими биологически активными агентами. Соответственно, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему описанию, могут вводиться перорально, ректально, парентерально, интракостально, интравагинально, внутрибрюшинно, местно (*например*, в виде порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея.

Термин «парентеральный» в настоящем документе относится к способам введения, которые включают внутривенные, внутримышечные, внутрибрюшинные, интратеральные, подкожные и внутрисуставные инъекции и инфузии.

Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно настоящему описанию в центральную нервную систему любым подходящим маршрутом, в том числе путем интравентрикулярной и интратекальной инъекции; интравентрикулярная инъекция может осуществляться с использованием интравентрикулярного катетера, например, присоединенного к резервуару, такому как резервуар Оммайя. Легочное введение может также осуществляться, *например*, с применением ингалятора или небулайзера, и введения в состав с аэрозольным агентом.

Может быть желательным введение антигенсвязывающих полипептидов или композиций согласно настоящему описанию местно в участок, где требуется лечение; это может быть достигнуто, например, без ограничения, путем местной инфузии при проведении хирургической операции, местного введения, *например*, в сочетании с раневой повязкой после хирургической операции, путем инъекции, с помощью катетера, в виде суппозитория или имплантата, который состоит из пористого, непористого или гелеобразного материала, в том числе мембран, таких как силиконовые мембраны, или волокон. При введении белка, в том числе антитела согласно настоящему описанию,

предпочтительно тщательно выбирать материалы для применения, не абсорбирующие указанный белок.

Также предложены способы детекции экспрессии белка хемокина (с С-Х-С-мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека в образце, согласно некоторым вариантам реализации включающий приведение в контакт с антителом или его фрагментом указанного образца, и детекцию связывания, которое указывает на экспрессию CXCL13 в образце.

Композиции

Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции. Такие композиции содержат эффективное количество антитела, и приемлемый носитель. Согласно некоторым вариантам реализации указанная композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

Согласно конкретному варианту реализации термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный контролирующим органом федерального или государственного правительства, или приведенный в фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, и более конкретно у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или рецептурное вспомогательное вещество любого типа.

Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или основе, с которой вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина могут также применяться в качестве жидких носителей, в частности, для инъектируемых растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Указанная композиция, если это требуется, может

также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов, или рН-буферизующих агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для коррекции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Указанные композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов для продолжительного высвобождения и т.п. Композиция может быть введена в состав суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального применения может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.п., фармацевтического качества. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в руководстве «Remington's Pharmaceutical Sciences», E. W. Martin, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, совместно с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения указанному пациенту. Указанный состав должен подходить для способа введения. Исходный состав может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика.

Согласно одному из вариантов реализации состав с указанной композицией получают в соответствии со стандартными процедурами для фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости указанная композиция может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения болевых ощущений в сайте инъекции. Обычно ингредиенты поставляют либо по отдельности, либо в смеси друг с другом в единичной лекарственной форме, например, в виде лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может отпускаться с инфузионной бутылкой, содержащей стерильную воду фармацевтического качества или солевой раствор. Если композицию вводят путем

инъекции, может предоставляться ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором, чтобы смешать ингредиенты перед введением.

Соединения согласно настоящему описанию могут находиться в составах в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают образованные анионами, например, происходящими из соляной, ортофосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.п., и образованные катионами, например, происходящими из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа (III), изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.п.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение моноклональных антител мыши против CXCL13 человека

Указанный пример демонстрирует получение моноклональных антител мыши против CXCL13 человека с применением гибридомной технологии.

Иммунизация

Рекомбинантные белки CXCL13 человека применяли в качестве иммуногена для стимуляции продуцирования антител против CXCL13 человека. Мышей C57BL/6, Balb/c, SJL или крыс Wistar сначала иммунизировали подкожно (п/к) 50 мкг иммуногена, а затем иммунизировали внутрибрюшинно (в/б) или п/к раз в две недели 25 мкг иммуногена. Иммунный ответ отслеживали в пробах крови из ретроорбитального синуса. Скрининг в плазме проводили с применением ИФА-анализа связывания ELISA. Вкратце, CXCL13 человека, или CXCL13 мыши, или CXCL13 яванского макака наносили в концентрации 0,5 мкг/мл в течение ночи, а затем блокировали 5% БСА в ФСБ. Сыворотку в серийных разведениях инкубировали с нанесенным антигеном в течение 1 часа при комнатной температуре (RT). Полученные планшеты промывали ФСБ/Т и инкубировали с HRP-конъюгированным антителом козы против IgG мыши в течение 1 часа при КТ. Планшеты проявляли субстратом ТМВ, останавливали реакцию 1Н НСl и анализировали на спектрофотометре при OD 450–630 нм. Мышей с высокими титрами иммуноглобулина против CXCL13 отбирали для слияния и дополнительного скрининга. За 4 дня до умерщвления и извлечения селезенок проводили бустерную иммунизацию мышей в/б 25 мкг антигена. Селезенки использовали для слияния.

Слияние и скрининг гибридом

Проводили электрослияние спленоцитов с клетками линии миеломы мыши SP2/0 и высевали их в 96-луночный культуральный планшет. Супернатанты гибридом тестировали с применением ИФА-анализа связывания ELISA на связывающие CXCL13 человека компоненты. Для супернатантов клонов с положительными результатами анализа на связывание проводили скрининг на функцию блокирования связывания CXCL13 человека с его лигандом CXCR5 с применением клеточного анализа блокирования рецептора ИФА ELISA. Вкратце, 5×10^4 клетки CHO-K1-CXCR5 высевали в 96-луночный планшет с 100 мкл культуральной среды и инкубировали при 37°C в течение ночи. Клетки фиксировали 100 мкл 2% ПФА при КТ в течение 1 часа после однократного промывания ФСБ. Блокировали 1% БСА в ФСБ/Т в течение 1 часа при КТ. Супернатанты разводили ФСБ и предварительно инкубировали с равным объемом 0,3 мкг/мл CXCL13 человека в течение 30 минут при КТ. Затем переносили в каждую лунку с клетками по 100 мкл комплекса антитело-антиген на 30 минут при КТ. Образцы 3-кратно промывали 1×ФСБ/Т и добавляли в каждую лунку по 100 мкл 3 мкг/мл антитела человека Mab5261 для захвата CXCL13 человека; HRP-конъюгированное антитело против Fc человека использовали для непрямой детекции CXCL13 человека при связывании с клетками CHO-K1-CXCR5. Обнаружение вторичного антитела проводили, используя 100 мкл ТМВ, и останавливали реакцию 100 мкл 1Н HCl. Считывание проводили при 450 нм.

Клоны, демонстрирующие выраженную способность к блокированию в указанном анализе, выбирали для субклонирования. Супернатанты полученных после 1 раунда субклонов использовали для подтверждения связывания и способности блокировать рецепторы CXCL13 человека, или CXCL13 мыши, или CXCL13 яванского макака в анализе ИФА ELISA, с последующим секвенированием и дополнительным анализом. После указанного скрининга было идентифицировано 20 клонов (329F2E1, 348B10B1, 360A3D4E3, 414D10F5, 339A9E7, 339H3E2, 367F1C2, 21H12D9, 408E3F3, 415A3D1F4, 348E12F12, 368D6D10, 1H3A11, 355A1F6, 353F9C4, 19H7E10, 411A11E9, 64C10G1, 397C3B3), перекрестно связывающихся с CXCL13 человека и CXCL13 яванского макака, 14 клонов (402H2G12, 409G9C2, 410A4D10, 414G3F4, 416C9H8, 418D3H6, 423A6H6, 424H7F2, 427C4F11, 430D9B3, 432C12E1, 442C9H4, 445A6G7, 537C8D7), перекрестно связывающихся с CXCL13 человека и CXCL13 мыши, и 13 клонов (119H10D6, 30D6G1, 156H3H7, 168A2D4, 168D6F2, 175E3B10, 177D2G10, 178B2E8, 178E2B3, 181B11G12, 184H10B5, 345G1B4, 396A5A1) связывающихся только с CXCL13 человека.

Указанные антитела очищали из гибридомных супернатантов путем связывания с белком G на колонке, и определяли характеристики с применением ИФА-анализов связывания ELISA и клеточного ИФА-анализа блокирования ELISA. Связывающие и блокирующие свойства перечислены в **таблице 1**, а последовательности всех указанных клонов перечислены в **таблице 2**. 27 клонов, которые связывались только с huCXCL13, или связывались как с huCXCL13, так и с CXCL13 мыши, демонстрировали полную или частичную блокирующую активность. 11/20 клонов, которые связывались как с CXCL13 человека, так и с CXCL13 яванского макака, как оказалось, полностью блокировали связывание CXCL13 человека с CXCR5 человека. 11 блокаторов, которые связывались как с huCXCL13, так и с супоCXCL13, продуцировали в виде химерных IgG1-антител человека для дополнительного определения характеристик.

Таблица 1. Связывающие и блокирующие свойства

Антитела	EC50 (нг/мл)			IC50 (мкг/мл)
	связываются с huCXCL13	связываются с CXCL13 яванского макака	связываются с CXCL13 мыши	Анализы блокирования
329F2E1	16,58	12,46	Н/С	0,615
348B10B1	12,36	16,57	Н/С	Н/Д
360A3D4E3	6,641	17,77	Н/С	Н/Д
414D10F5	10,45	18,98	Н/С	1,142
339A9E7	21,56	24,54	Н/С	13,33
339H3E2	38,76	31,9	Н/С	Н/Д
367F1C2	66,79	55,71	Н/С	Н/Д
21H12D9	15,64	61,85	Н/С	1,273
408E3F3	23,68	70,59	Н/С	1,493
415A3D1F4	13,23	71,14	Н/С	0,6983
348E12F12	63,6	76,53	Н/С	Н/Д
368D6D10	86,44	139,9	Н/С	Н/Д
1H3A11	63,28	144,6	Н/С	10,14
355A1F6	94,25	153,9	Н/С	Н/Д
353F9C4	134,5	171,6	Н/С	Н/Д
19H7E10	38,52	195,9	Н/С	2,218
411A11E9	20,14	252,4	Н/С	0,793
64C10G1	31,39	347	Н/С	0,3303
397C3B3	344,1	400,6	Н/С	Н/Д
71F4A3	26,63	1013	Н/С	3,017
119H10D6	39,29	Н/С	Н/С	0,5334
130D6G1	19,18	Н/С	Н/С	1,232
156H3H7	13,44	Н/С	Н/С	4,592
168A2D4	134,3	Н/С	Н/С	0,2898
168D6F2	21,77	Н/С	Н/С	2,093

175E3B10	32,63	H/C	H/C	1,418
177D2G10	54,42	H/C	H/C	~ 911,9
178B2E8	420,3	H/C	H/C	~ 3,372e+009
178E2B3	15,33	H/C	H/C	0,9739
181B11G12	22,34	H/C	H/C	0,7025
184H10B5	27,24	H/C	H/C	4,85
345G1B4	13,8	H/C	H/C	3,24
396A5A1	13,51	H/C	H/C	1,005
402H2G12	5,777	H/C	35,71	8,719
409G9C2	2266	H/C	538,2	11,74
410A4D10	2139	H/C	760,8	8,38
414G3F4	3662	H/C	3008	26,45
416C9H8	5840	H/C	1966	8,456
418D3H6	48660	H/C	7492	23,33
423A6H6	1558	H/C	248,2	8,959
424H7F2	10,95	H/C	12,09	1,1
427C4F11	1329	H/C	201,8	7,918
430D9B3	26,45	H/C	54,71	3,849
432C12E1	5099	H/C	744,3	12,65
433E4H11	2872	H/C	700,8	14,25
442C9H4	9852	H/C	2960	18,2
445A6G7	2908	H/C	1228	14,88
537C8D7	12,78	H/C	37,47	2,455

H/C = Нет связывания, Н/Д = Нет данных

Таблица 2. Последовательности антител, выбранные на основании скрининга

Цепь антитела	Последовательности (с сигнальным пептидом)	SEQ ID NO:
329F2E1-VH	MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRY WMSWVRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFII SRDNAKNTLYLQ MSKVRSEDTALYYCARQDDYDYAMDYWGQGTSTVTVSS	1
329F2E1-VL	MGIKMESQIQVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVSTGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSRTDFTFTIS SVQTEDPAVYYCHQYYTIPLTFGAGTELELK	2
348B10B1 -VH	MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTE YIMHWKQSHGRSLEWIGGINPDNGDTTYNQKFKGKATLTVDKSSTTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAGGVLDYWGQGTSTVTVSS	3
348B10B1 -VL	MMSPAQFLFLVLWIRETNQDGVMTQTPLTSLVTFGQPAISCKSSQSLD DSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVFYCWQGTHTFPFTFGSGTKLEIK	4
360A3D4E3 -VH	MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTE YIMHWKQSHGRSLEWIGGINPDNGDTTYNQKFTGKATLTVDKSSTTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAGGVLDYWGQGTSTVTVSS	5
360A3D4E3 -VL	MMSPAQFLFLVLWIRETNQDGVMTQTPLTSLVTFGQPAISCKSSQSLD DSDGRTYLNWLLQRPQGSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVFYCWQGTHTFPFTFGSGTKLEIK	6
414D10F5 -VH	MDIRLSLVFLVLFIKGVQCEVQLAESGGGLVQPGRSCLKSASGFTFSD YYMAWFRQAPKGLEWVASISYDGGDSFYRDSVKGRFTI SRDNAKSSLYL QMDSLRSEDATYYCTTEEDYSGSFPDYWGQGVMTVTVSS	7

414D10F5 -VL	MMAVQVQLLGLLLIWLPA MRCDIQMTQSPSFLSASVGDRV TINCKASQNNIN KYLNWYQQKLGEAPKRLIYDTNNLQAGIPSRFSGSGSGTDYTLTINSLQP EDFATYFCLQHNSLYTFGGG TKLEIK	8
339A9E7 -VH	MRVLILLWLFTA FPGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YAWNWNRQFPGNKLEWMGYISYSGDTSYNPSLRSRISITRDTSKNQFFLQ LNSVTAEDTAKYYCVAGHFDYWGQGTTLTVSS	9
339A9E7 -VL	MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVMTQTPLTSLITLGQPASISCKSSQSLL DSDGETYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK	10
339H3E2 -VH	MGWSWIFLFLLSGTAGVLSVQLQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTE YIMHWVKQSHGRSLEWIGGINFNNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAGGVMDYWGQGTSTVTVSS	11
339H3E2 -VL	MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK	12
367F1C2 -VH	MRVLILLWLLTALPGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YAWNWRHFPGNKLEWMGYISYTGSSSYNPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQ LNSVTSEDATATYYCVAGHFDYWGPGTTLTVSS	13
367F1C2 -VL	MMSPAQFLFLLVLWIREANGDVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK	14
21H12D9 -VH	MGWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQSGPVLVRPGASVKMSCKASGYTFTD YYMNWVKQSHGKSLWIGVINFNNGGTTYKEKFKGKATLTVDKSSGTAYM ELNSLTSEDSAVYYCARDYDAGYWGQGTTLTVSS	15
21H12D9 -VL	MGFKMEFHTQVFVFLWLSGVDGDIVMTQFQKFMSTTVGDRVSITCKAS QNVDTA VAWYQHKPGQSPKLLIYASASHRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLADYFCQYTD FPLTFGAGTKLEIK	16
408E3F3 -VH	MDRLTSSILLLLVPAYVLSHVTLRESGPGVLQPSKTLSLTCSFSGFSLST SAMVVSWIRQSSGMSLEWLA AIDWEGDKYYNPSLESRLTVSRDISDTQVF LRITSVDVADTATYYCAVMSSADSHSVLDAWGQGVSVTVSS	17
408E3F3 -VL	MMAALQLLGVLLLWLPA MRCDIKMTQSPSFLSASVGDRV TINCKASQNIH NYLNWYQQKFGEAPRLLIYNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ EDVATYFCLQHSSSLTFGSGTKLEIN	18
415A3D1F4 -VH	MKLWLNWIFLLTLLNGIQCEVKLLESGGGLVQAGGSMRLSCGAFGFTVTD FYINWIRQPAKAPWELGFM RNKANGYTT EYNPSVKGRFTISRNTQNM YLQMNLT RTEDTAIYYCARSRYNADDYYGVMDVWGQGASVTVSS	19
415A3D1F4 -VL	MGVPTQLLVLLLWITDAICDIQMTQFPASLSASLGETVSI ECLASEDIY NNLAWYQQKPGKSPQLLIYYTNSLQDGVPSRFSGTSGTQYSLKINSLES EDAATYFCLQDSEYPWTFGGG TKLKLK	20
348E12F12 -VH	MRVLILLWLFTA FPGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YAWNWRQFPGNKLEWMGYISYSGDTSYNPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQ LNSVTTEDTATYYCVAGHFDYWGQGTTLTVSS	21
348E12F12 -VL	MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVMAQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSNLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI IRVEAEDLGVIYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK	22
368D6D10 -VH	MRVLILLWLFTA FPGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YAWNWRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQ LNSVTTEDTATYYCVAGHFDYWGQGTTLTVSS	23
368D6D10 -VL	MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVMTQTPLTSLITIGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK	24
1H3A11 -VH	MNFGLSLIFLVVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSS YAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSDTYYPDNVKGRTISRDN AKNNLYL QM SHLKSEDTAMYYCARDYYGSSYEDYAMDYWGQGTSTVTVSS	25
1H3A11 -VL	MRPSIQFLGLLLFWLHGAQCDIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDIN KYITWYQHKPGKGRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEP EDIATYYCLQYDNLYTFGGG TKLEIK	26

355A1F6 -VH	MRVLILLWLFTAFFGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YAWSWIRQFPGNKLEWMGYISYSDSTSYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQ LNSVTAEDTATYYCAAGHFDYWGQGTILTVSS	27
355A1F6 -VL	MMSPAQFLFLLVLWIREINGDVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIK	28
353F9C4-VH	MRVLILLWLFTAFFGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YAWSWIRQFPGNKLEWMGYITYSDSTSYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQ LNSVTAEDTATYYCAAGHFDYWGQGTILTVSS	29
353F9C4-VL	MMSPAQFLFLLVLWIREINGDVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIK	30
19H7E10-VH	MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQSGPELVKPGASVKISQASGYAFSD YYMNWVQSHGKRLEWIGDINPNDGTTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYM DLRSLTSEDSAVYYCARLSWSFFAMDYWGQGTSTVTVSS	31
19H7E10-VL	MGIKMESQIQVFVFLWVSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVSSGVAWYQKPGQSPKVLIIYSASHRHTGVPDRFTASGSGTDFTFTIS SVQAEDLAVYYCQYYNTPTWTFGGGKLEIK	32
411A11E9-VH	MDIRLSLGLVLFIKGVQCEVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCVVSGETFSD YYMAWVRQTPTKGLEWVASINYDGGDTYYRDSVKGRFTVSRNNAKSSFL QMDSLRSEDATYYCKTEEDYDGSYVMDAWGQASVIVSS	33
411A11E9-VL	MMAVQVLLGLLLIWLPAVRCDIQTQSPSFLSASVGDRTISCKASQININ KELTWYQKLGKAPKRLIYNTNIIQTGIPSRFSGSGSNTDYTLTISSLQP EDFATYFCLQQSSLYTFGAGTKLEIK	34
64C10G1-VH	MNFGLSLIFLVLVLKGIQCEVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGETFSS YAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSDAYYPDNVKGRFTISRDNKNNLYL QMSHLKSEDTAMYYCARDYYGSGYEDSPMDYWGQGTSTVTVSS	35
64C10G1-VL	MRPSIQFLGLLLFWLHGAQCDIQTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDIN KYIAWYQHKPGKGPRLIIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISINLEP EDFATYYCLQYDNLYTFGGGKLEIK	36
397C3B3-VH	MRVLILLWLFTAFFGILSDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YAWNWIQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISINRDTSKNQFFLQ LNSVTTEDTATYYCVAGHFDYWGQGTTLTVSS	37
397C3B3-VL	MMSPAQFLFLLVLWIREINGDVMTQTPLTSLITIGQSASISCKSSQSLL DSDGKTYLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIK	38
71F4A3-VH	MDFGLIFFIVALLKGVQCEVQLQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRY WMSWVRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIIISRDNAKNTLYLQ MSKVRSEDTALYYCARQDDYEYYAMDYWGQGTSTVTVSS	39
71F4A3-VL	MGIKMESQIQVSVFVILWLSGVDGDIVMTQSHKSMSTSVGDRVSITCKAS QDVNTGVAWYRQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVDPDRFTGSGSGTDFTFTIS SVQAEDLAVYYCQYYSTPLTFGAGTKLEIK	40
119H10D6-VH	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNT YWIEWVKQRPBGHGLEWIGEILPGSESTDYNEKFKDKATFTADISSNTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARDYYGYFFDYWGQGTTLTVSS	41
119H10D6-VL	MGIKMESQIQVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVSTAVVWYQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTFTIS SVQAEDLAVYYCQQHYSSPRTFGGGKLEIK	42
130D6G1-VH	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKSTGYTFST YWIEWVKQRPBGHGLEWIGEILPGSDSTNSNEKFEKGATFTADTSSNTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARDYYGYFFDYWGQGTTLTVSS	43
130D6G1-VL	MGIKMESQIQVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKAS QDVSTAVAWYQKPGQSPKLLIYSTSYRYTGVDPDRFTGSGSGTDFTFTIS NVQAEDLAVYYCQQHYTTPRTFGGGKLEIK	44
156H3H7 -VH	MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFD YYMNWVRQSHGKSLWIGDINPNDGTTYNQKFKGKATLTVDTSSTVYM ELRSLTSEDSAVYYCAGYDEDDHYAMDYWGQGTSTVTVSS	45

156H3H7 -VL	MGIKMESQMVFVFLWLWSGVDGDYVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVSTGVAWYQQNPGQSPKLLIYSASHRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTIS SVQAEDLAVYYCQQYYTTPWTFGGGKLEIK	46
168A2D4-VH	MGWSWIIILFLVSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGNTLTD YYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGDIIYNQKFKGKATLTVAKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAIYYDPYHAMDYWGQGTSTTVSS	47
168A2D4-VL	MGIKMESQIQVFVFLWLWSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVRDRVSITCKAS QDVSTGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTIS SVQAEDLAVYYCQQYSVPLTFGAGTKLEIK	48
168D6F2-VH	MGWSCIMFLAATATGVHSQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCQASGYTFTS YWMHWKQRPGRGLEWIGIDPDGATKDNEKFKTKATLTVDKPSRTAYI QLSSLTSEDSAVFYCARGSTVVPAGDYFAMDYWGQGTSTTVSS	49
168D6F2-VL	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTPSPTSLAVSLGQRATMSCRASESVD NYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLDSGIPARFSASGSRTDFTLTIN PVETDDVATYYCQQSNKDPWTFGGGKLEIK	50
175E3B10-VH	MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSEFSLSV FGMGVWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDEKYNPALKSRLTISKDTSKNQVF LKIANVDTADTATYFCARIDGYYDFDYWGQGTTLTVSS	51
175E3B10-VL	MKLPVRLVLMFWIPASSSDVMTQTPLSLPVSLGTQASIFCRSSHSIVQ DNGNTYLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGYYCFQGSYVPYTFGGGKLEIK	52
177D2G10-VH	MDRLTSSFLLLIVPAYVLSQIALKESGPGILQSSQTLSTLCSFSGFSLST SGMHVGWFRQPSGKLEWLAHIYWDKRYNPALKSRLTISKDTSRNQVF LNLTNVDTADTATYYCARRGGDYDEGFDYWGQGTTLTVSS	53
177D2G10-VL	MKLPVRLVLMFWIPASSSDVMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVH SNGFTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTEFTLRIS RVEAEDLGYYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIK	54
178B2E8-VH	MYFRLSSVFLVLIILKGVQCEVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFTD YYMTWVRQVPEKGLEWVANINYDGSRTNYLDSLKSRIISRDNAKNILYL QMSSLKSEDTATYYCARDGNYHFYGM DYWGQGTSTTVSS	55
178B2E8-VL	MGIKMESQIQAFVFLWLWSGVDGDFVLTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVSTAVAWYQQKPGQSPQLLIYWASTRHTGVDPDRFTGSGSGTDYTLTIS SVQAEDLALYYCQQHYSTPWFPGGKLEIK	56
178E2B3-VH	MEWSRVFIFLLSVTAGIHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTN HLIEWVKQRPQGLEWIGVINPGSGGTYNEKFKGKATVTADKSSSTVYM QLNSLTSEDSAVYFCARSSDGYEEDYFDYWGQGTTLTVSS	57
178E2B3-VL	MDFQVQIFSFLLISASVII SRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSS VNYMQWYQQKSGTSPKRWIYDTSELASGVDPDRFSGSGSGTSYSLTISME AEDVATYYCQQWSSDPITFGAGTKLEIK	58
181B11G12-VH	MYFRLSSVFLVLIILKGVQCEVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSD YYMAWVRQVPEKGLEWVANINYDGSRTYYLDSLKSRIISRDNAKNILYL QMSSLKSEDTATYYCVRDVAYDDSYAMDYWGQGTSTTVSS	59
181B11G12-VL	MRPSIQFLGLLFLWLHGAQCDIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDIN KYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEP EDIATYYCLQYDSLTYTFGGGKLEIK	60
184H10B5-VH	MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSEFSLSV FGMGVWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDEKYNPALKSRLTISKDTSKNQVF LKIANVDTADTATYYCARIDGYYDFDYWGQGTTLTVSS	61
184H10B5-VL	MKLPVRLVLMFWIPASSSDVMTQTPLSLPVSLGTQASISCRSSHSIVQ DNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGYYCFQGSYVPYTFGGGKLEIK	62
345G1B4-VH	MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLST SNMGVWIRQPSGKGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVF LKIASVDTADTATYYCARSTTLVAFDYWGQGTTLTVSS	63
345G1B4-VL	MESQTQVLSLLFWVSGTCGDIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPTFGGKLEIK	64

396A5A1-VH	MGRLTSSFLLLVIPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLST SGMGIGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDIKRYNPALKSRLTVSKDTSTSQVF LNIAVDTADIATYFCARSTTVVAFDYWGQGTTLTVSS	65
396A5A1-VL	MESQTQVLMSSLLFWVSGTCGDILMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFTGTGSGTDFTLT ISSVQAEDLAIYYCQNDYDYPFTFGGKTLEIK	66
402H2G12-VH	MDRLTSSFLLLVIPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFSGFSLST YGMGVGIRQPSGKGLEWLANIWDDDKYYNPQLNRLTISKDTSNNQAF LKINNVDATATATYFCARSELIMPYPFDYWGQGVVRTVSS	67
402H2G12-VL	MDMRAHTQFLGFLLLWFPGARCDIQTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQD IDNHLIWFQQKPGKSPRPMIYYATNLANGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSL ESEDMAHYHCLQFKQYPFTFGSGKTLEIK	68
409G9C2-VH	EVQLQQSGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSITSSYWWTVRQPPGKGLEWIG EIIYHSGRPYNPQLSRATISVDKSRNQFSLNLTSTVTAADTAVYYCAKTA AVSYWYFDLWGRGTLTVSS	69
409G9C2-VL	DIKMNQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIGNDLIWFQQKPGKSPRPMIYY ASNLANGVPSRFSGRRSESNYSLTISSLESEDMAHYHCLQFKQYPFTFGA GKTLEIK	70
410A4D10-VH	EVQLQQSGPGLVLRPSGTLSTCAVSGGSISSRNWWGWVRQPPGKGLEWIG EIIYHSGGTNYNPQLSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREF GDSVWYFDLWGRGTLTVSS	71
410A4D10-VL	DIVITQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIGNDLVWFQQKPGKSPRPMIYY ATNLADGVP SRFSGRRSESKYSLTISNLESEDMAHYHCLQFKQYPFTFGA GKTLEIK	72
414G3F4-VH	EVQLQQSGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSITSSYWWIWRQPPGKGLEWIG EIIYHSGRPYNPQLSRVTISVDKSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCAREA GDSVWYFDLWGRGTLTVSS	73
414G3F4-VL	DILLTQSPSSISASLGDRVTITCQASQDIGNELIWFQQKPGKSPRPMIYY ATSLADGVP SRFSGSTSGSDYSLTIGSLESEDMAHYHRLQFKQYPFTFGS GTRLEIK	74
416C9H8-VH	QVTLKESGPEILQPSQTLSTCTFSGFSLSPYGMGVGIRQPSGKGLEWL ANIWDDDKYYNPQLINRLTISKDTSNNQAFKLTNVDTTDSATYYCVRS ELVMPYPFDYWGQGVMTVSS	75
416C9H8-VL	DIQTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIENDLVWFQQKPGSRPRPMIYY ATNLANGVPSRFSGRRSESDYSLTISSLESEDMAHYHCLQFKQYPFTFGA GKTLEIK	76
418D3H6-VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFSGFSLSTYGMGVGIRQPSGKGLEWL ANIWDDDKYYNPQLINRLTISKNTSNNQAFKLTNVDAPDTATYYCARS ELVMPYPFDYWGQGVMTVSS	77
418D3H6-VL	DIQTQSPSSLSASLGDRITMTQASQDIGELIWFQQKPGKSPWPVIYY TANLASGVP SRFSGSRSGSHYSLTISSLESEDMAHYHCLQYKQYPFTFGS GKTLEIK	78
423A6H6-VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFSGFSLSTYGMGVGIRQPSGKGLEWL ANIWDDDKYYNPQLNRLTISKDTSNNQAFKLTNVDATATYYCARS ELIMPYPFDYWGQGVVRTVSS	79
423A6H6-VL	DIQTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIDNHLIWFQQKPGKSPRPMIYY ATNLANGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDMAHYHCLQFKQYPFTFGS GKTLEIK	80
424H7F2-VH	MDRLTSSFLLLVIPAYVLSQVTLKESGPEILQPSQTLTLTCTFSGFSLSP YGMGVGIRQPSGKGLEWLANIWDDDKYYNPQLINRLTISKDTSNNQAF LKITNVDTTDSATYYCVRSELVMPYPFDYWGQGVMTVSS	81
424H7F2-VL	MDMRAHTQFLGFLLLWFPGARCDIQTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQD IENDLIWFQQKPGKSPRPMIYYATNLANGVPSRFSGRRSESNYALTISSL ESEDMAHYHCLQFKQYPFTFGAGKTLEIK	82
427C4F11-VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFSGFSLTITYGMGVGIRQPSGKGLEWL ANIWDDDKYSNPQLSRLTISKDTSNNQAFKITNVDATATYYCARS ELVMPYPFDYWGQGVVRTVSS	83

427C4F11-VL	DIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIDNHLIWFQQKPGRSRPRIYY ATNLANGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDMADYHCLQFKQYPFTFGS GTKLEIK	84
430D9B3-VH	MDRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPEILQPSQTLSTCTFSGFSLSP YGMGVGWIRQPSGKGLEWLANIWWDDDKYYNPSLINRLTISKDTSNNQAF LKITNVDTTDSATYYCVRSELVMPYVPFDYWGQGVMTVSS	85
430D9B3-VL	MDMRAHTQFLGFLLLWFPGARCDIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQD IENDLIWFQQKPGKSPRPLIYYATNLANGVPSRFSGRRSESNYSLTISL ESEDMDYHCLQFKQYPYTFGAGTKLELK	86
432C12E1-VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWL ANIWWDDDKYYNPSLKNRLTISKDTSNNQAFKLTNVDADTATYYCARS EIVMPYVPFDYWGQGVMTVSS	87
432C12E1-VL	DIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIGNDLIWFQQKPGKSPRPIYY ATNLANGVPSRFSGSGSGSVYSLTISSLESEDMADYHCLQFKQYPFTFGS GTKLEIK	88
442C9H4 -VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWL ANIWWDDDKYYNPSLINRLTISKNTSNNQAFKLTNVDAPDTATYYCARS ELVMPYVPFDYWGQGVMTVSS	89
442C9H4 -VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRITITCQASQDIGIDLIWFQQKPGKSPWPVIYY TANLASGVP SRFSGSRSGSHYSLTISSLESEDMADYHCLQYKQYPFTFGS GTKLEIK	90
445A6G7-VH	QVTLKESGPEILQPSQTLSTCTFSGFSLSPYGMGVGWIRQPSGKGLEWL ANIWWDDDKYYNPSLINRLTISKDTSNNQAFKLTNVDTTDSATYYCVRS ELVMPYVPFDYWGQGVMTVSS	91
445A6G7-VL	DIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIGNDLIWFQQKPGKSPRPLIYY ATNLANGVPSRFSGRRSESNYSLTISSESEDMADYHCLQFKQYPYTFGA GTKLELK	92
537C8D7-VH	MDIRLSLVFLVLFIKGVQCEVQLVESGGGLVLPGRSLKLSCAASGFTFSD YAMAWVRQAPKKGLEWVATVFYDGSDFYRDSVKGRFTISRDNASTLYL QMDSLRSEDATYYCAREGDYYSRHVYVGYNWFPHWGQGLTVTVSS	93
537C8D7-VL	MGVPTHLLGLLLLWITHAMCDIRMTQSPASLSASLGGETVNIECLTSEDIN SELAWYQQKPGKFPQFLIYNANSLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQS EDVATYFCQQYNSYPLTFGSGTELEIK	94

Пример 2. Блокирующие свойства химерных антител против CXCL13 в клеточном анализе блокирования

В указанном примере тестировали блокирование химерных антител против CXCL13 с клетками CHO-K1-CXCR5. Вкратце, 5×10^4 клеток CHO-K1-CXCR5 высевали в 96-луночный планшет с 100 мкл культуральной среды и инкубировали при 37°C в течение ночи. Клетки фиксировали 100 мкл 2% ПФА при КТ в течение 1 часа после однократного промывания ФСБ. Образцы блокировали 1% БСА в ФСБ/Т в течение 1 часа при КТ. Получали серийные 3-кратные разведения антител, начиная с 50 мкг/мл, в 1%БСА/ФСБ/Т и предварительно инкубировали с равным объемом CXCL13 человека в концентрации 0,3 мкг/мл в течение 30 минут при КТ. В каждую лунку с клетками переносили по 100 мкл комплекса антитело-антиген на 30 минут при КТ. Образцы 3-кратно промывали $1 \times$ ФСБ/Т и добавляли в каждую лунку по 100 мкл 3 мкг/мл антитела

человека Mab5261 для захвата CXCL13 человека; HRP-конъюгированное антитело против Fc человека использовали для непрямой детекции CXCL13 человека при связывании с клетками CHO-K1-CXCR5.

Обнаружение вторичного антитела проводили, используя 100 мкл ТМВ, и останавливали реакцию 100 мкл 1Н НСl. Затем считывали при 450 нм. Значения IC₅₀ обобщены в **таблице 3**, где приведены IC₅₀ для блокирующих свойств. Из всех клонов полную блокирующую активность демонстрировали 415A3D1, 64C10G1, 1H3A11, 414D10F5, 411A11E9, 21H12D9, 71F4A3, 329F2E1, а 408E3F3, 19H7E10, 339A6E7 оказались частичными блокаторами.

Таблица 3. Блокирующие свойства химерных антител

Антитела	IC ₅₀ (мкг/мл)
415A3D1	0,985
64C10G1	1,099
1H3A11	1,19
414D10F5	1,262
411A11E9	1,713
21H12D9	1,892
71F4A3	3,017
408E3F3	7,636
19H7E10	15,1
329F2E1	3,546
339A6E7	~ 1,425e+011

Пример 3. Связывающие свойства химерных антител против CXCL13

Анализ связывания на основе ИФА Elisa. Были более подробно описаны характеристики связывания антител, функционально блокирующих CXCL13 человека, с huCXCL13 и cynoCXCL13. Вкратце, 100 мкл CXCL13 человека или CXCL13 яванского макака наносили в концентрации 0,5 мкг/мл в течение ночи, после чего блокировали 200 мкл 5% БСА в ФСБ. Антитела в серийных разведениях инкубировали с нанесенным антигеном в течение 30 минут при КТ. Полученные планшеты промывали ФСБ/Т и инкубировали с HRP-конъюгированным антителом козы против Fc IgG человека в течение 30 минут при КТ. Планшеты проявляли субстратом ТМВ после 5-кратного промывания 1× ФСБ/Т, останавливали реакцию 1н НСl и анализировали на спектрофотометре при OD 450–630 нм. Значения EC₅₀ приведены в **таблице 4**.

Таблица 4. Связывающие свойства химерных антител

Антитела	EC ₅₀ (нг/мл)	
	CXCL13 человека	CXCL13 яванского макака
415A3D1	72,89	46,94
64C10G1	40,06	56,26
1H3A11	55,34	143,9
411A11E9	48,46	100,4
414D10F5	62,84	1190
21H12D9	53,62	48,8
71F4A3	38,06	81,44
329F2E1	51,13	41,62

Аффинность связывания huCXCL13, определенная с применением поверхностного плазмонного резонанса. 411A11E9, 415A3D1, 64C10G1, 21H12D9, 329F2E1, 71F4A3 были выбраны для получения Fab и протестированы на аффинность связывания. Связывание указанных антител с huCXCL13 изучали с помощью Biacore 8K. 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТК, 0,05% Tween-20, pH 7,4 использовали в качестве подвижного буфера; 10 mM глицин-HCl, pH 2,0 использовали в качестве буфера для регенерации. Белок CXCL13 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с применением метода аминного сочетания (уровень иммобилизации ~30RU). Fab в серийных разведениях (концентрации 0–16 нМ) проводили над иммобилизованным CXCL13 при скорости потока 30 мкл/мин. Продолжительность фаз диссоциации составляла 600 с. Результаты представлены в **таблице 5** ниже.

Таблица 5. Тестирование на аффинность с помощью Biacore

Антитела	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
21H12D9	2,14E+06	7,31E-04	3,41E-10
329F2E1	9,66E+05	5,81E-04	6,02E-10
411A11E9	2,06E+06	3,26E-04	1,58E-10
415A3D1	2,56E+06	3,06E-03	1,20E-09
64C10G1	2,81E+06	5,00E-04	1,78E-10
71F4A3	1,85E+06	2,85E-04	1,54E-10

Пример 4. Блокирующие свойства химерных антител против CXCL13 в анализе сигнализации

Ингибирование индуцированного CXCL13 потока кальция химерными антителами против CXCL13. Обработка CXCL13 человека стимулировала

мобилизацию внутриклеточного кальция в клетках CHO-K1-CXCR5. При добавлении к анализу антител против CXCL13 в серийных разведениях указанные антитела дозозависимым образом ингибировали генерацию потока кальция в клетках CHO-K1-CXCR5. На основании результата анализа аффинности связывания и клеточного анализа блокирования 64C10G1, 1H3A11, 411A11E9, 21H12D9, 71F4A3, 329F2E1, и 415A3D1 были выбраны для тестирования в анализе потока кальция.

Клетками CHO-K1-CXCR5 ($1,5 \times 10^4$ клеток/лунку) в среде покрывали 384-луночный аналитический планшет. На следующий день их инкубировали с 0,75 мкг/мл rhCXCL13 в присутствии или в отсутствие антител против CXCL13 в серийных разведениях в аналитическом буфере (HEPES, 20 нМ HBSS) при 37°C в течение 30 минут. Готовили рабочий буфер с кальций-чувствительным красителем и добавляли к клеткам. Затем переносили смесь в ячейки и измеряли интенсивность флуоресценции (FI) с помощью FLIPR Tetra. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Graphpad Prism (v5.0).

Как видно на **фиг. 1** при сравнении с положительным потоком кальция FI (пунктирная линия), индуцированным CXCL13, все химерные антитела против CXCL13 обладали аналогичной по эффективности активностью блокирования индуцированного CXCL13 потока кальция в клетках CHO-K1-CXCR5, за исключением 415A3D1.

Блокирование опосредованной CXCL13 IP1-сигнализации химерными антителами против CXCL13. CXCL13, связанный с лигандом CXCR5, который представляет собой сопряженный с G-белком рецептор, на клетках CHO-K1-CXCR5 может индуцировать накопление инозитолмонофосфата (IP1), стабильного нижестоящего метаболита IP3, индуцированного активацией каскада фосфолипазы C (PLC). Набор с IP1 (Cisbio) использовали для тестирования блокирующей эффективности антител против CXCL13. Указанный набор предназначен для конкурентного иммунологического анализа для измерения накопления IP1 в клетках с помощью технологии HTRF. Природный IP1, продуцируемый клетками, конкурировал с d2-меченым IP1 за связывание с меченым криватом антителом против IP1. При стимуляции клеток CHO-K1-CXCR5 CXCL13 происходит продуцирование IP1 в клетках и он конкурирует с d2-меченым IP1, что приводит к понижающей регуляции детектируемого сигнала по сравнению с отсутствием обработки CXCL13.

0,25 мкг/мл CXCL13 инкубировали в присутствии или в отсутствие антител против CXCL13 в серийных разведениях в стимулирующей среде (культуральная среда F12, содержащая 5 мМ LiCl, функция которого заключается в накоплении IP1) в течение 20 минут при КТ в 384-луночном аналитическом планшете. В каждую лунку переносили по 5×10^4 клеток. Инкубировали планшет в течение 1 часа в инкубаторе для клеток (37 °С, увлажнение, 5% CO₂). После инкубации в каждую лунку добавляли рабочий раствор со смесью IP1-d2 и меченым криптоном антителом против IP1. Планшет герметизировали и инкубировали в течение 1 часа при КТ. Наконец, герметизирующий слой удаляли и планшет считывали на HTRF-совместимом ридере с получением значения при 665 нм/615 нм.

Как видно на **фиг. 2**, кривая IgG означает продуцирование IP1, индуцированного CXCL13. Пунктирной линией отмечен базальный уровень IP1 в клетках CHO-K1-CXCR5 без обработки CXCL13. Все антитела против CXCL13, 64C10G1, 21H12D9, 329F2E1, 411A11E9, 71F4A3 и 1H3A11 были способны эффективно дозозависимым образом блокировать IP1-сигнал, и эффективность ингибирования была аналогичной.

Пример 5. Блокирование *in vitro* обусловленной CXCL13 миграции клеток химерным антителом против CXCL13

Блокирование миграции клеток (человека) BaF3-CXCR5 к CXCL13. Известно, что CXCL13 связывается со своим рецептором CXCR5 и может обуславливать миграцию клеток. Для оценки эффективности ингибирования антителами против CXCL13 в анализе миграции использовали сверхэкспрессирующую CXCR5 человека линию клеток, BaF3-CXCR5.

Смесь 50 нг/мл CXCL13 инкубировали в присутствии или в отсутствие антител против CXCL13 в серийных разведениях в среде для разведений (сбалансированный солевой раствор Гея + 0,1% БСА) в 96-луночном культуральном планшете в течение 30 минут при КТ. Затем переносят по 68,5 мкл/лунку смеси на дно планшета с фильтром Transwell с размером пор 5 мкм (Corning, 3387). В верхнюю камеру добавляли по 100 мкл/лунку ($6,5 \times 10^5$ клеток) клеток BaF3-CXCR5. Кроме того, для вычитания фонового сигнала имелись лунки с добавлением только среды для хемотаксиса в нижней части планшета и клетками в верхней камере. После 3 часов инкубации в инкубаторе камеру разбирали и весь объем из нижней части планшета переносили в 96-луночный культуральный

планшет. В аналитический планшет добавляли по 10 мкл/лунку резазурина (R&D) и планшет инкубировали дополнительно в течение 16–24 часов в инкубаторе. Флуоресценцию измеряли при длинах волн 544 нм и 590 нм.

Вычитали фоновый сигнал и использовали программное обеспечение GraphPad (v5.0) для построения аппроксимирующей кривой титрования. На **фиг. 3** пунктирными линиями обозначена FI при индуцированной CXCL13 миграции. При добавлении в анализ антител против CXCL13, 64C10G1, 21H12D9, 329F2E1, 411A11E9, 71F4A3 и 1H3A11 происходила дозозависимая понижающая регуляция FI, что означает дозозависимое ингибирование миграции клеток BaF3-CXCR5 антителами против CXCL13. Эффективность ингибирования протестированными антителами указанной миграции клеток BaF3-CXCR5 была сопоставимой.

Ингибирование миграции первичных клеток миндалин человека к CXCL13. Для дополнительного изучения блокирующей функции антител против CXCL13 использовали анализ миграции первичных клеток миндалин человека. Тестировали эффект антител против CXCL13, описанный выше, на миграцию первичных клеток миндалин человека.

Ткани миндалин человека измельчали поршнем шприца на 1 мл и пропускали через клеточное сито с размером ячеек 70 мкм. Собирают клетки и промывают ФСБ. Затем выделяют лимфоциты в градиенте фиколла. Промывают и ресуспензируют лимфоциты с использованием среды для хемотаксиса (RPMI 1640, содержащая 0,5% БСА). Затем инкубируют 0,5 мкг/мл CXCL13 с антителами в серийных разведениях или контрольным IgG в среде для хемотаксиса при КТ в течение 30 минут. Переносят по 150 мкл/лунку смеси в нижнюю часть 96-луночного планшета с фильтром Transwell с размером пор 5 мкм (Corning, 3387), а в верхнюю камеру добавляют по 50 мкл/лунку клеток миндалин человека (5×10^5 клеток). Кроме того, для вычитания фонового сигнала предусматривают лунки с добавлением только среды для хемотаксиса в нижней части планшета и клетками в верхней камере. После инкубации в течение 3 часов в инкубаторе камеру разбирают и утилизируют фильтр. Добавляют в каждую лунку по 1,67 мкг/мл кальцеина-АМ (ThermoFisher) и инкубируют дополнительно в течение 20 минут в инкубаторе. Измеряют флуоресценцию при длинах волн 485 нм и 520 нм.

Вычитают фоновую интенсивность флуоресценции (FI) из необработанных данных и получают гистограмму с применением программного обеспечения GraphPad (v5.0). Как видно на **фиг. 4**, по сравнению с отсутствием обработки IgG все антитела против CXCL13 зависимым от титра образом ингибировали хемотаксис первичных клеток миндалин человека.

Пример 6. Эффективность терапии антителом против CXCL13 *in vivo* у яванского макака

При нормальном иммунном ответе CXCL13 и его рецептор CXCR5 вовлечены в хоуминг В-клеток и формирование зародышевого центра. Зависимый от Т-клеток антительный ответ (TDAR) на гемоцианин фиссуреллы (KLH) у иммунизированных яванских макаков представляет собой модель комплексного иммунного ответа. В указанной модели иммунного ответа мы можем оценить взаимодействия В- и Т-лимфоцитов, переключение классов и формирование зародышевого центра за счет продуцирования антигенспецифических антител (т.е. специфического антительного ответа от IgM до IgG).

Яванских макаков случайным образом распределяли в 2 группы (по 3 обезьяны на группу) и иммунизировали 1 мл 10 мг/мл KLH путем внутримышечной инъекции на 0 день. 30 мг/кг химерного антитела против CXCL13 64C10G1 вводили посредством внутривенной инъекции в чередующиеся периферические сосуды на -1, 4, 9 дни. В то же время обезьянам контрольной группы вводили равный объем солевого раствора. Сыворотку собирали из подкожной вены передней лапы или бедренной вены на -4, -1, 4, 9 и 14 дни для детекции специфических IgG/IgM против KLH. ИФА Elisa для определения в сыворотке уровня IgG и IgM обезьяны против KLH выполняли в соответствии с инструкцией производителя (Life Diagnostics, KLHM-3-INT и KLHG-3-INT). На 14 день собирают цельную кровь и выделяют мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) в градиенте фикола. Анализируют экспрессию в популяции В-клеток (CD20⁺, Biolegend) и CXCR5 (Thermofisher) на поверхности В-клеток в проточном цитометре (Becton-Dickinson). Регистрацию данных и анализ проводили с применением программного обеспечения FlowJo.

Как показано на **фиг. 5А**, несмотря на наблюдавшиеся индивидуальные различия в группе солевого раствора, можно видеть, что обработка антителом против CXCL13

64C10G1 могла ингибировать продуцирование специфического IgG против KLN. Уровень специфического IgM против KLN также был незначительно ингибирован, как видно на **фиг. 5B**. Как показано на **фиг. 5C**, авторы настоящего изобретения предположили, что антитело 64C10G1 нейтрализовало антиген CXCL13 в периферической крови, что приводило к уменьшению популяции В-клеток на периферии. Снижение уровня CXCL13 в периферической крови приводило к снижению связывания и интернализации его рецептора CXCR5, что, в свою очередь, повышало экспрессию CXCR5 на поверхности В-клеток, как видно на **фиг. 5D**. Результаты в указанной модели *in vivo* показали, что антитело против CXCL13 64C10G1 высокоэффективно блокировало продуцирование GC В-клеток, переключение классов, продуцирование антигенспецифического высокоаффинного антитела, что означало ингибирование формирования зародышевого центра.

Пример 7. Блокирование CXCL13-зависимой миграции спленоцитов мыши суррогатным моноклональным антителом мыши против CXCL13

Авторы настоящего изобретения получали суррогатное антитело против CXCL13 424H7F2, способное к перекрестному связыванию с CXCL13 мыши, путем гибридомного скрининга, описанного в **примере 1**. Для изучения блокирующей активности авторы настоящего изобретения тестировали эффект 424H7F2 на индуцированную gmCXCL13 миграцию первичных спленоцитов мыши.

Мышей C57BL/6, иммунизированных пептидом MOG₃₅₋₅₅ с адъювантом, умерщвляли на 10 день, и извлекали селезенки. Селезенки измельчали поршнем шприца на 1 мл и пропускали через клеточное сито с размером ячеек 40 мкм. Эритроциты лизировали буфером для лизиса. Клетки фильтровали и промывали средой для хемотаксиса. 1 мкг/мл gmCXCL13 (R&D) инкубировали с антителом против CXCL13 424H7F2 или контрольного IgG в разных концентрациях при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем переносили по 150 мкл/лунку смеси в нижнюю часть планшета с фильтром Transwell с размером пор 0,5 мкм и 50 мкл/лунку спленоцитов (1×10^7 /мл) в верхнюю камеру. Инкубируют планшет Transwell в инкубаторе для клеток в течение 3 часов. Наконец, утилизируют фильтр, добавляют по 1,67 мкг/мл кальция-АМ в каждую лунку и инкубируют дополнительно в течение 20 минут. Флуоресценцию измеряют на длинах волн 485 нм и 520 нм.

В результате, как видно на **фиг. 6**, моноклональное антитело мыши 424H7F2 было способно дозозависимым образом ингибировать миграцию первичных спленоцитов мыши к CXCL13 мыши.

Пример 8. Эффективность *in vivo* терапии моноклональным антителом мыши против CXCL13 в модели на мышах NP-CGG

Для определения того, способно ли антитело против CXCL13 опосредовать ингибирование функции CXCL13 при формировании зародышевого центра (GC) во вторичных лимфоидных органах и переключении классов изотипа необученными В-клетками, мышей C57BL/6 иммунизировали NP-CGG (100 мкг/мышь) путем внутрибрюшинной инъекции на 0 день и инъекции 30 мг/кг антитела против CXCL13 424H7F2 или ФСБ внутрибрюшинно на -1, 2, 5, 8, 11 день. На 14 день мышей умерщвляют и анализируют популяцию В-клеток зародышевых центров ($B220^{+}IgD^{-}GL7^{+}Fas^{+}$), переключение классов ($B220^{+}IgD^{-}GL7^{+}IgM^{-}IgG1^{+}$) с помощью проточной цитометрии в селезенке, уровень высокоаффинного NP-специфического (NP5) IgG1 с применением ИФА Elisa в сыворотке, и формирование GC путем иммуногистохимического окрашивания ($IgD^{+}PNA^{+}$) в селезенке.

Популяция GC В-клеток в селезенке значительно уменьшалась у мышей, получавших лечение антителом против CXCL13 424H7F2 по сравнению с контрольной группой (**фиг. 7А**). На **фиг. 7В** видно, что популяция $IgG1^{+}$ В-клеток уменьшалась у мышей, получавших лечение 424H7F2, что указывает на нарушение переключения классов антителом против CXCL13. Снижение уровня NP5-специфического антитела IgG1 в сыворотке в получавших лечение 424H7F2 мышей указывало на блокирование аффинного созревания антигенспецифического IgG1 антителом против CXCL13 (**фиг. 7С**). Результат ИГХ прямо показал, что образование GC было серьезно нарушено у мышей при лечении антителом против CXCL13 424H7F2 по сравнению с контрольной группой (**фиг. 7D**). В совокупности все указанные результаты выявили, что антитело против CXCL13 424H7F2 эффективно блокировало функцию CXCL13 *in vivo*.

Пример 9. Картирование эпитопов антитела против CXCL13 для выявления критически важных для связывания остатков

Результаты биннинга эпитопов показали, что все антитела против CXCL13, перекрестно связывающиеся с CXCL13 яванского макака, в том числе 64C10G1, 21H12D9, 329F2E1, 411A11E9, 71F4A3 и 1H3A11, содержали один и тот же эпитоп. Авторы настоящего изобретения использовали 64C10G1 при проведении картирования эпитопов для идентификации критически важных для связывания с антигеном CXCL13 остатков. Кроме того для скрининга синтезировали контрольное антитело в соответствии с последовательностью в опубликованном патенте (WO2012/031099 A2).

Клетки трансфицировали разными конструкциями дикого типа (WT) или мутантными конструкциями Fab 64C10G1, где каждая аминокислота была заменена на аланин, в общей сложности 87 аминокислот. Затем определяли связывание тестового Fab с каждым мутантным клоном из библиотеки аланинового сканирования, в двух повторностях, с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии. Для каждой точки вычитали фоновую флуоресценцию из необработанных данных, а затем нормировали по реактивности Fab относительно целевого белка WT. Для каждого мутантного клона строили график зависимости средних значений связывания от экспрессии (представлена контрольной реактивностью). Для предварительной идентификации первичных критических клонов (красные кружки) устанавливали пороговые значения (пунктирные линии) >70% от связывания WT с контрольным АТ и <20% от связывания WT с тестовым Fab.

Как показано на **фиг. 8А**, в диапазон между выбранными пороговыми значениями попадали мутантные клоны в правом нижнем углу (красные кружки), мутации в которых давали отрицательные результаты связывания с 64C10G1 Fab, но положительные результаты связывания с контрольными Fab, в том числе F20, P22, R24 и F25 (**таблица 6**), что указывает на критическую важность указанных остатков для связывания Fab 64C10G1. Авторы настоящего изобретения привели на **фиг. 8В** диаграмму, отражающую кристаллическую структуру, критически важные для связывания Fab 64C10G1 остатки визуализированы и показаны на указанной кристаллической структуре.

Таблица 6: Идентификация критически важных остатков для связывания Fab 64C10G1

Реактивность связывания (% от WT)		
Мутация	Fab 64C10G1	Контрольный Fab
F20A	9,4 (2)	109,9 (1)
P22A	14,8 (1)	97,4 (12)
R24A	-3,3 (1)	88,0 (10)
F25A	-3,2 (0)	127,3 (1)

Пример 10. Гуманизация и определение аффинности mAb мыши

А. 21H12D9

Гены вариабельных областей антитела мыши 21H12D9 использовали для получения гуманизированного MAb. На первом этапе указанного процесса последовательности аминокислот VH и VK 21H12D9 сравнивали с доступной базой данных генных последовательностей Ig человека для обнаружения в целом максимально совпадающих генных последовательностей Ig зародышевой линии человека. Для тяжелой цепи наиболее близкое совпадение у человека было обнаружено для гена *IGHV1-2*02*. Для легкой цепи максимальное совпадение у человека было обнаружено для гена *IGKV1-12*01*.

Затем были разработаны гуманизированные последовательности вариабельных доменов, где последовательности CDR1-3 VH 21H12D9 прививали на каркасные последовательности гена *IGHV1-2*02*, а CDR1-3 легкой цепи 21H12D9 прививали на каркасные последовательности гена *IGKV1-12*01*. Затем для прививки CDR с получением гуманизированной VH1 была выбрана акцепторная последовательность человека, *цепь VH антитела против Sm (VH1/DK1 или DM1/JH4b) человека pir||S49530*. Для прививки CDR с получением гуманизированной VL1 была выбрана *частичная вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина G, [Homo sapiens] AIT38653.1*. Затем создавали трехмерную модель для определения наличия в каркасе каких-либо положений, в которых замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека могла бы повлиять на связывание и/или конформацию CDR. Для тяжелой цепи были идентифицированы K12, V20, M48, V68, M70, R72, S77 и V112 (нумерация по Kabat) в каркасной области человека и подвергнуты обратным мутациям с возвращением к эквивалентным аминокислотам мыши т.е.: K12V, V20M, M48I, V68A, M70L, R72V,

S77G и V112L. В случае легкой цепи были идентифицированы A13, L78 (нумерация по Kabat) в каркасной области человека и подвергнуты обратным мутациям с возвращением к эквивалентным аминокислотам мыши, т.е.: A13T, L78V.

Таблица 7. Последовательности и области CDR антитела мыши 21H12D9

Цепь или домен антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием и жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
21H12D9 -VH	EVQLQQSGPVLVRPGASVKMSCKASGYTFT DYYMN WVKQSHGKSLEWIGV INPNNGGTTYKEKFKG KATLTVDKSSGTAYMELNSLTSEDSAVYYCARD D YDAGY WGQGTTLTVSS	95
21H12D9 -VL	DIQMTQFQKFMSTTVGDRVSIT CASQNVDTAVA WYQHKPGQSPKLLIYS ASHRYT GVPRFTGSGSGTDFLTITSNVQSEDLADYFC QQYTD FPLT FGA GTKLELK	96
CDRH1	DYYMN	97
CDRH2	VINPNNGGTTYKEKFKG	98
CDRH3	DDYDAGY	99
CDRL1	KASQNVDTAVA	100
CDRL2	SASHRYT	101
CDRL3	QQYTD FPLT	102

Гуманизированные последовательности перечислены в **таблице 8**: 21H12D9-VH1 и 21H12D9-VL1 представляют собой полностью гуманизированные последовательности, а 21H12D9-VH2, 21H12D9-VH3, 21H12D9-VH4, 21H12D9-VL2, 21H12D9-VL3 представляют собой последовательности с разными обратными мутациями.

Таблица 8. Гуманизированные последовательности

Цепь антитела	Последовательности (обратные мутации выделены жирным шрифтом и подчеркиванием)	SEQ ID NO:
21H12D9 -VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMNWVRQAPGGGLEWMGV INPNNGGTTYKEKFKGRVTMT RD TSISTAYMELSR LR SDDTAVYYCARD D YDAGYWGQGT L TVSS	103
21H12D9 -VH2	QVQLVQSGAEV V KPGASVKVSKASGYTFTDYYMNWVRQAPGGGLEWMGV INPNNGGTTYKEKFKGRVTMT V DT S ISTAYMELSR LR SDDTAVYYCARD D YDAGYWGQGT L TVSS	104
21H12D9 -VH3	QVQLVQSGAEV V KPGASVKVSKASGYTFTDYYMNWVRQAPGGGLEW I GV INPNNGGTTYKEKFKGR ATLT V DT S ISTAYMELSR LR SDDTAVYYCARD D YDAGYWGQGT L TVSS	105
21H12D9 -VH4	QVQLVQSGAEV V KPGASV K MSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGGGLEW I GV INPNNGGTTYKEKFKGR ATLT V DT S I GTAYMELSR LR SDDTAVYYCARD D YDAGYWGQGT L TVSS	106
21H12D9 -VL1	DIQMTQSPSSVSASVGD R VTITCKASQNVDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASHRYTGVPSR F SGSGSGTDFLTIT S LQPEDFATYYCQQYTD FPLT FGQ GTRLEIK	107
21H12D9 -VL2	DIQMTQSPSSVS T SVGD R VTITCKASQNVDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASHRYTGVPSR F SGSGSGTDFLTIT S LQPEDFATYYCQQYTD FPLT FGQ GTRLEIK	108
21H12D9 -VL3	DIQMTQSPSSVS T SVGD R VTITCKASQNVDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASHRYTGVPSR F SGSGSGTDFLTIT S V QPEDFATYYCQQYTD FPLT FGQ	109

	GTRLEIK	
--	---------	--

B. 64C10G1

Гены переменных областей антитела мыши 64C10G1 использовали для получения гуманизированного MAb. На первом этапе указанного процесса последовательности аминокислот VH и VK 64C10G1 сравнивали с доступной базой данных генных последовательностей Ig человека для обнаружения в целом максимально совпадающих генных последовательностей Ig зародышевой линии человека. Для тяжелой цепи наиболее близкое совпадение у человека было обнаружено для гена *IGHV3-7*01*. Для легкой цепи наиболее близкое совпадение у человека было обнаружено для гена *IGKV1-33*01*. Затем были разработаны гуманизированные последовательности переменных доменов, где последовательности CDR1-3 VH 64C10G1 прививали на каркасные последовательности гена *IGHV3-7*01*, а CDR1-3 легкой цепи 64C10G1 прививали на каркасные последовательности гена *IGKV1-33*01*. Затем для прививки CDR с получением гуманизированной VH1 была выбрана акцепторная последовательность человека: *частичная переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина антипневмококкового антитела 8B3 [Homo sapiens], AAV48954.1*. Для прививки CDR с получением гуманизированной VL1 была выбрана *частичная переменная область легкой цепи kappa иммуноглобулина [Homo sapiens], ACY78416.1*. Затем создавали трехмерную модель для определения наличия в каркасе каких-либо положений, в которых замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека могла бы повлиять на связывание и/или конформацию CDR. В случае легкой цепи были идентифицированы Y49, V58, F71, I83 (нумерация по Kabat) в каркасной области человека и подвергнуты обратным мутациям с возвращением к эквивалентным аминокислотам мыши, т.е.: Y49H, V58I, F71Y, I83F.

Таблица 9. Последовательности и области CDR антитела мыши 64C10G1

Цепь или домен антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием и жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
64C10G1 -VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SYAMS WVRQTPEKRLWVA T ISDGGSDA YYPDNVKG RFTISRDNAKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARD Y YSGGYEDSPMDY WGQGTSTVTVSS	110
64C10G1 -VL	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITC KASQDINKYIA WYQHKPGKGPRLLI HY TSTLQ PGIPSRFSGSGSGRDYSFISINLEPEDFATYYC LQYDNLYT FGGG TKLEIK	111
CDRH1	SYAMS	112

CDRH2	TISDGGSDAYYPDNVKG	113
CDRH2 (ПТМ)	TISEGGSDAYYPDNVKG	114
CDRH3	DYYGSGYEDSPMDY	115
CDRH3 (ПТМ)	DYYGSGYEESPM DY	116
CDRL1	KASQDINKYIA	117
CDRL2	YTSTLQP	118
CDRL3	LQYDNLTY	119

Гуманизированные последовательности перечислены в **таблице 10**: 64C10G1-VH1 и 64C10G1-VL1 представляют собой полностью гуманизированные последовательности, 64C10G1-VL2, 64C10G1-VL3 представляют собой последовательности с разными обратными мутациями.

Таблица 10. Гуманизированные последовательности

Цепь антитела	Последовательности (обратные мутации выделены жирным шрифтом и подчеркиванием)	SEQ ID NO:
64C10G1 -VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAT ISDGGSDAYYPDNVKGRTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY YGSGYEDSPMDYWGQGTLLTVSS	120
64C10G1-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLIYY TSTLQPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCLQYDNLTYTFGGG TKLEIK	121
64C10G1-VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLI <u>HY</u> TSTLQPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPED <u>F</u> ATYYCLQYDNLTYTFGGG TKLEIK	122
64C10G1-VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLI <u>HY</u> TSTLQPG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPED <u>F</u> ATYYCLQYDNLTYTFGGG TKLEIK	123
64C10G1-VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLI <u>HY</u> TSTLQPG <u>I</u> PSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TFTISSLQPED <u>F</u> ATYYCLQYDNLTYTFGGG TKLEIK	124

C. 71F4A3

Гены вариабельных областей антитела мыши 71F4A3 использовали для получения гуманизированного МАb. На первом этапе указанного процесса последовательности аминокислот VH и VK 71F4A3 сравнивали с доступной базой данных генных последовательностей Ig человека для обнаружения в целом максимально совпадающих генных последовательностей Ig зародышевой линии человека. Для тяжелой цепи наиболее близкое совпадение у человека было обнаружено для гена *IGHV3-7*01*. Для легкой цепи наиболее близкое совпадение у человека обнаружено для гена *IGKV1-33*01*. Затем были разработаны гуманизированные последовательности вариабельных

доменов, где последовательности CDR1-3 VH 71F4A3 прививали на каркасные последовательности гена *IGHV3-7*01*, а CDR1-3 легкой цепи 71F4A3 прививали на каркасные последовательности гена *IGKV1-33*01*. Затем для прививки CDR с получением гуманизированной VH1 была выбрана акцепторная последовательность человека: *частичная переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина [Homo sapiens], AAA18280.1*. Для прививки CDR с получением гуманизированной VL1 была выбрана *частичная переменная область легкой цепи kappa иммуноглобулина [Homo sapiens], ACY78416.1*. Затем создавали трехмерную модель для определения наличия в каркасе каких-либо положений, в которых замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека могла бы повлиять на связывание и/или конформацию CDR. Для тяжелой цепи были идентифицированы E5, V47, A48, L85 (нумерация по Kabat) в каркасной области человека и подвергнуты обратным мутациям с возвращением к эквивалентным аминокислотам мыши, т.е.: E5Q, V47I, A48G, L85V. В случае легкой цепи была идентифицирована L78 (нумерация по Kabat) в каркасной области человека и подвергнута обратной мутации с возвращением к эквивалентной аминокислоте мыши, т.е.: L78V.

Таблица 11. Последовательности и области CDR антитела мыши 71F4A3

Цепь или домен антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием и жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
71F4A3 -VH	EVKLLQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFS RYWMS WVRRAPGKGLEWIG E INPDSSTINYAPSLKD KFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCAR QD DYEYYAMDY WGQGTSTVSS	125
71F4A3 -VL	DIVMTQSHKSMSTSVGDRVSITC KASQDVNTGVA WYRQKPGQSPKLLIYS ASYRYT GVPDFRTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYC QYYSTPLT FGA GTKLELK	126
CDRH1	RYWMS	127
CDRH2	EINPDSSTINYAPSLKD	128
CDRH2 (ПТМ)	EINPESSTINYAPSLKD	129
CDRH3	QDDYEYYAMDY	130
CDRL1	KASQDVNTGVA	131
CDRL2	SASYRYT	132
CDRL3	QYYSTPLT	133

Гуманизированные последовательности перечислены в **таблице 12**: 71F4A3-VH1 и 71F4A3-VL1 представляют собой полностью гуманизированные последовательности, 71F4A3-VH2, 71F4A3-VH3, 71F4A3-VH4, 71F4A3-VL2 представляют собой последовательности с разными обратными мутациями.

Таблица 12. Гуманизированные последовательности

Цепь антитела	Последовательности (обратные мутации выделены жирным шрифтом и подчеркиванием)	SEQ ID NO:
71F4A3-VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAEI NPDSSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDD YEYYAMDYWGQGTTTVTVSS	134
71F4A3-VH2	EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAEI NPDSSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDD YEYYAMDYWGQGTTTVTVSS	135
71F4A3-VH3	EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVGEI NPDSSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSVRAEDTAVYYCARQDD YEYYAMDYWGQGTTTVTVSS	136
71F4A3-VH4	EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEI NPDSSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSVRAEDTAVYYCARQDD YEYYAMDYWGQGTTTVTVSS	137
71F4A3-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNTGVAWYQQKPKAPKLLIYS ASYRYTGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQYYSTPLTFGG GTKLEIK	138
71F4A3-VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNTGVAWYQQKPKAPKLLIYS ASYRYTGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSVQPEDIATYYCQYYSTPLTFGG GTKLEIK	139

D. 411A11E9

Гены переменных областей антитела мыши 411A11E9 использовали для получения гуманизированного MAb. На первом этапе указанного процесса последовательности аминокислот VH и VK 411A11E9 сравнивали с доступной базой данных генных последовательностей Ig человека для идентификации в целом максимально совпадающих генных последовательностей Ig зародышевой линии человека. Для тяжелой цепи наиболее близкое совпадение у человека было обнаружено для гена *IGHV3-7*01*. Для легкой цепи максимальное совпадение у человека было обнаружено для гена *IGKV1-17*01*.

Затем были разработаны гуманизированные последовательности переменных доменов, где последовательности CDR1-3 из VH 411A11E9 были привиты на каркасные последовательности гена *IGHV3-7*01*, а CDR1-3 легкой цепи 411A11E9 были привиты на каркасные последовательности гена *IGKV1-17*01*. Затем для прививки CDR с получением гуманизированной VH1 была выбрана акцепторная последовательность человека, *частичная переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина [Homo sapiens] ACS96177.1*. Для прививки CDR с получением гуманизированной VL1 была выбрана *частичная переменная область легкой цепи kappa иммуноглобулина, [Homo sapiens] AAZ09050.1*. Затем создавали трехмерную модель для определения наличия в каркасе каких-либо положений, в которых замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека могла бы повлиять на связывание и/или конформацию CDR. Для тяжелой цепи были идентифицированы A24, I70, R98, T105 (нумерация по Kabat) в каркасной области

человека и подвергнуты обратным мутациям с возвращением к эквивалентным аминокислотам мыши, т.е.: A24V, I70V, R98T, T105A. Для легкой цепи были идентифицированы V58, F71, Y87 (нумерация по Kabat) в каркасной области человека и подвергнуты обратным мутациям с возвращением к эквивалентным аминокислотам мыши, т.е.: V58I, F71Y, Y87F.

Таблица 13. Последовательности и области CDR антитела мыши 411A11E9

Цепь или домен антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием и жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
411A11E9 -VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKVVSQFTFS DYYMA WVRQTPKGLEWVAS IN YDGGDT YYRDSVKG GRFTVSRNNAKSSLFLQMDSLRSEDATYYCKT EE DYDGSYVMDA WGQASVIVSS	140
411A11E9 -VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRTVISC KASQ NINKELTWYQQKLGKAPKRLIYN TN ILQ T GIPSRFSGSGSNTDYTLTISLQPEDFATYFC LQSS LYT FG AG TKLELK	141
CDRH1	DYYMA	142
CDRH2	SIN YDGGDTYYRDSVKG	143
CDRH3	EEDYDGSYVMDA	144
CDRL1	KASQ NINKELT	145
CDRL2	NTN ILQ T	146
CDRL3	LQSSLYT	147

Гуманизированные последовательности перечислены в **таблице 14**: 411A11E9-VH1 и 411A11E9-VL1 представляют собой полностью гуманизированные последовательности, а 411A11E9-VH2, 411A11E9-VH3, 411A11E9-VH4, 411A11E9-VL2, 411A11E9-VL3, 411A11E9-VL4 представляют собой последовательности с разными обратными мутациями.

Таблица 14. Гуманизированные последовательности

Цепь антитела	Последовательности (обратные мутации выделены жирным шрифтом и подчеркиванием)	SEQ ID NO:
411A11E9 -VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYYMA WVRQAPGKGLEWVAS IN YDGGDTYYRDSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREE DYDGSYVMDAWGQGT LVT VSSGS	148
411A11E9 -VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYYMA WVRQAPGKGLEWVAS IN YDGGDTYYRDSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC T EE DYDGSYVMDAWGQGT LVT VSSGS	149
411A11E9 -VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA V SGFTFS DYYMA WVRQAPGKGLEWVAS IN YDGGDTYYRDSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC T EE DYDGSYVMDAWGQGT LVT VSSGS	150
411A11E9 -VH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA V SGFTFS DYYMA WVRQAPGKGLEWVAS IN YDGGDTYYRDSVKGGRFT V SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC T EE DYDGSYVMDAWGQ G ALVT VSSGS	151
411A11E9 -VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ NINKELTWYQQKPGKAPKRLIYN TN ILQ TGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQSSLYT FG QG TKLEIK	152
411A11E9 -VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ NINKELTWYQQKPGKAPKRLIYN TN ILQ TGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY F CLQSSLYT FG QG TKLEIK	153

411A11E9-VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINKELTWYQQKPGKAPKRLIYN TNILQGTG I PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY F CLQQSSLYTFGGG TKLEIK	154
411A11E9-VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINKELTWYQQKPGKAPKRLIYN TNILQGTG I PSRFSGSGSGTE Y TLTISLQPEDFATY F CLQQSSLYTFGGG TKLEIK	155

Гены гуманизированных VH и VL продуцировали синтетическим путем в виде гуманизированных Fab, а затем, соответственно, клонировали в векторы, содержащие константные домены цепей гамма 1 человека и каппа человека. Гуманизированные VH и VK спаривали с получением Fab, а затем очищали для дальнейшего ранжирования по скорости диссоциации (**таблица 15**) и тестирования аффинности.

Таблица 15. Ранжирование по скорости диссоциации с использованием Biacore

Fab	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
411A11E9-Химерный	4050000	0,00287	7,08E-10
411A11E9-VH1VL1	12500000	0,013	1,04E-09
411A11E9-VH1VL2	78200	0,00114	1,45E-08
411A11E9-VH1VL3	523000	0,00176	3,37E-09
411A11E9-VH1VL4	346000	0,00063	1,82E-09
411A11E9-VH2VL1	2370000	0,00283	1,19E-09
411A11E9-VH2VL2	2580000	0,00271	1,05E-09
411A11E9-VH2VL3	2360000	0,00335	1,42E-09
411A11E9-VH2VL4	1660000	0,00105	6,34E-10
411A11E9-VH3VL1	2290000	0,00242	1,06E-09
411A11E9-VH3VL2	1780000	0,00163	9,19E-10
411A11E9-VH3VL3	2050000	0,00207	1,01E-09
411A11E9-VH3VL4	2190000	0,00109	4,98E-10
411A11E9-VH4VL1	2730000	0,00281	1,03E-09
411A11E9-VH4VL2	2080000	0,00196	9,44E-10
411A11E9-VH4VL3	2140000	0,00266	1,24E-09
411A11E9-VH4VL4	1740000	0,00107	6,11E-10
71F4A3-Химерный	3300000	0,00184	5,56E-10
71F4A3-VH3VL1	2140000	0,000987	4,62E-10
71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4)	3200000	0,00136	4,26E-10
71F4A3-VH1VL2	2850000	0,00147	5,16E-10
71F4A3-VH2VL1	1950000	0,00108	5,54E-10
71F4A3-VH2VL2	2250000	0,00137	6,07E-10
71F4A3-VH3VL2	2500000	0,00139	5,57E-10
71F4A3-VH4VL1	1700000	0,001	5,9E-10
71F4A3-VH4VL2	2570000	0,00136	5,3E-10
21VH12D9-Химерный	1170000	0,00139	1,18E-09
21VH12D9-VH1VL2	380000	0,000757	1,99E-09
21VH12D9-VH2VL2	414000	0,000802	1,94E-09
21VH12D9-VH1VL3	584000	0,000975	1,67E-09
21VH12D9-VH2VL1	570000	0,000991	1,74E-09
21VH12D9-VH2VL3	501000	0,000992	1,98E-09

21VH12D9-VH4VL1	618000	0,00107	1,73E-09
21VH12D9-VH4VL2	742000	0,00114	1,54E-09
21VH12D9-VH4VL3	729000	0,00116	1,59E-09
21VH12D9-VH3VL1	744000	0,00131	1,76E-09
21VH12D9-VH3VL2	940000	0,00138	1,47E-09
21VH12D9-VH3VL3	1410000	0,00207	1,47E-09
21VH12D9-VH1VL1	2420000	0,00323	1,33E-09
64C10G1-Химерный	2680000	0,00218	8,14E-10
64C10G1-VH1VL3	1820000	0,00543	2,98E-09
64C10G1-VH1VL4	1940000	0,00713	3,68E-09
64C10G1-VH1VL1	4330000	0,0255	5,89E-09
64C10G1-VH1VL2	2690000	0,00515	1,92E-09

Из всех образцов гуманизированных Fab были выбраны 71F4A3-VH2VL1, 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4), 71F4A3-VH1VL2, 71F4A3-VH3VL1, 411A11E9-VH1VL4, 411A11E9-VH3VL4, 411A11E9-VH2VL4, 411A11E9-VH3VL2, 411A11E9-VH1VL2, 21H12D9-VH1VL1, 21H12D9-VH2VL2, 21H12D9-VH3VL3, 21H12D9-VH1VL2, 64C10G1-VH1VL3, 64C10G1-VH1VL4, 64C10G1-VH1VL1, 64C10G1-VH1VL2 для тестирования аффинность с использованием Biacore 8K. В качестве подвижного буфера использовали 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,05% Tween-20, pH 7,4, в качестве буфера для регенерации – 10 мМ глицин-HCl, pH2,0. Белок CXCL13 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с применением метода аминного сочетания (уровень иммобилизации ~250RU). Fab в серийных разведениях (концентрации 0–20 нМ) проводили над иммобилизованным CXCL13 при скорости потока 30 мкл/мин. Продолжительность фаз диссоциации составляла 600 с. Результаты представлены в **таблице 16** ниже.

Таблица 16. Результаты определения аффинности

Клоны	Fab	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	Rmax (RU)	χ^2 (RU ²)
71F4A3	71F4A3-VH2VL1	1,70E+06	1,45E-03	8,53E-10	9	7,87E-03
	71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4)	2,02E+06	1,25E-03	6,19E-10	12	2,09E-02
	71F4A3-VH1VL2	1,84E+06	1,16E-03	6,28E-10	11,1	1,80E-02
	71F4A3-Химерный	1,80E+06	1,41E-03	7,82E-10	18,5	9,61E-02
	71F4A3-VH3VL1	1,64E+06	1,53E-03	9,34E-10	11,3	1,80E-02
411A11E9	411A11E9-Химерный	2,11E+06	1,56E-03	7,40E-10	29,9	3,82E-01
	411A11E9-VH1VL4	1,86E+06	1,57E-03	8,44E-10	7,3	8,06E-03
	411A11E9-VH3VL4	9,06E+05	8,23E-04	9,08E-10	12,4	2,29E-02
	411A11E9-VH2VL4	9,53E+05	8,87E-04	9,31E-10	9,5	8,33E-03
	411A11E9-VH3VL2	1,05E+06	1,26E-03	1,20E-09	10	4,91E-03

	411A11E9-VH1VL2	5,70E+05	1,61E-03	2,83E-09	5,4	1,76E-03
21H12D9	21H12D9-VH1VL1	1,66E+06	2,03E-03	1,23E-09	103,7	2,14E+00
	21H12D9-VH2VL2	1,48E+06	1,95E-03	1,32E-09	91,8	1,29E+00
	21H12D9-VH3VL3	1,49E+06	1,82E-03	1,22E-09	98,1	1,82E+00
	21H12D9-VH1VL2	1,44E+06	1,71E-03	1,19E-09	107,6	1,88E+00
	21H12D9-Химерный	1,82E+06	2,58E-03	1,42E-09	65,1	7,01E-01
64C10G1	64C10G1-Химерный	2,68E+06	2,18E-03	8,14E-10	16,2	1,17E-01
	64C10G1-VH1VL3	1,82E+06	5,43E-03	2,98E-09	7,2	8,56E-03
	64C10G1-VH1VL4	1,94E+06	7,13E-03	3,68E-09	6,5	1,06E-02
	64C10G1-VH1VL1	4,33E+06	2,55E-02	5,89E-09	4,9	9,55E-03
	64C10G1-VH1VL2	2,69E+06	5,15E-03	1,92E-09	6,2	1,22E-02

Пример 11. Связывающие и блокирующие свойства гуманизированных Fab против CXCL13

В указанном примере в клеточном анализе блокирования с белками CXCL13 тестировали связывающие и блокирующие свойства гуманизированных антител против CXCL13.

Для оценки связывающей и блокирующей активности гуманизированных Fab 71F4A3H и 64C10G1H проводили тест связывания ИФА ELISA и клеточные анализы блокирования. В таблице 17 приведен обзор EC50 и IC50, демонстрирующий, что эффективность связывающей активности гуманизированных 71F4A3, 64C10G1 выше, чем у химерных антител. Эффективность блокирующей активности по сравнению с химерным эквивалентом у гуманизированного 71F4A3 снижалась приблизительно в 2 раза; гуманизированный 64C10G1 сохранял эффективность блокирования на уровне химерного эквивалента.

Таблица 17. Связывающие и блокирующие свойства гуманизированных Fab

	Гуманизированные Fab	EC50(нМ)	IC50(нМ)
71F4A3	71F4A3-химерный (Fab)	1,488	5,073
	71F4A3-VH2VL1(Fab)	0,8186	10,46
	71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4) (Fab)	0,974	11,19
	71F4A3-VH1VL2(Fab)	1,178	10,73
	71F4A3-VH3VL1(Fab)	0,5745	11,27
64C10G1	64C10G1-химерный (Fab)	1,707	7,224

	64C10G1-VH1VL1(Fab)	1,291	7,793
	64C10G1-VH1VL2(Fab)	1,23	7,022
	64C10G1-VH1VL3(Fab)	1,072	7,693
	64C10G1-VH1VL4(Fab)	0,7842	6,878

Пример 12. Функциональные свойства гуманизированных Fab против CXCL13 с удаленными ПТМ

Блокирование индуцированной CXCL13 IP1-сигнализации. Чтобы избежать вовлечения слишком большого числа сайтов мутации, на основании результатов связывания в ИФА ELISA и клеточного анализа блокирования авторы настоящего изобретения выбрали последовательность 64C10G1-VH1VL2, 64C10G1-VH1VL3, 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4), 71F4A3-VH1VL2 для удаления сайта ПТМ (посттрансляционной модификации); в 64C10G1 мутантными положениями были D53E и D107E в VH, в 71F4A3 мутантным положением было D54E в VH; и дополнительно верифицировали в анализе IP1, упомянутом выше.

Как показано на **фиг. 9А**, хотя блокирующая активность гуманизированных вариантов 64C10G1 была ниже, чем у химерного антитела, показатели антитела 64C10G1-VH1VL2 (D53E, D107E) с удаленными ПТМ были несколько лучше, чем у других гуманизированных вариантах. На **фиг. 9В** видно, что ингибирующая активность 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4) (D54E) выше, чем у других гуманизированных вариантов и сопоставима с активностью химерного антитела.

Блокирование миграции первичных клеток миндалин человека к CXCL13 человека. На основании результатов анализа IP1 авторы настоящего изобретения оценивали эффект 64C10G1-VH1VL2, 64C10G1-VH1VL2 (D53E, D107E), 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4) и 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4) (D54E) в анализе миграции первичных клеток миндалин человека.

Как можно видеть на **фиг. 10**, и 64C10G1-VH1VL2 (D53E, D107E), и 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4) (D54E) могут дозозависимым образом блокировать индуцированную CXCL13 человека миграцию первичных клеток миндалин человека. Способность к ингибированию была сопоставимой.

Пример 13. Связывающие свойства полноразмерных гуманизированных IgG против CXCL13 с удаленными ПТМ

В указанном примере тестировали связывающие свойства гуманизированных антител против CXCL13 в отношении белков huCXCL13 и cynoCXCL13.

Для оценки связывающей активности гуманизированных антител 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4), 71F4A3-VH1VL2, 64C10G1-VH1VL2, 64C10G1-VH1VL3 получали синтетическим путем в виде гуманизированного полноразмерного IgG1, содержащего константные домены цепей гамма 1 человека и каппа человека с удаленными ПТМ в VH для повышения стабильности антитела. В 71F4A3 мутантным было положение D54E, а в 64C10G1 мутантными были положения D53E, D107E. Тестирование на перекрестное связывание с huCXCL13 и cynoCXCL13 проводили с помощью ИФА-анализов связывания ELISA. Результаты обобщены на **фиг. 11**, из которой видно, что эффективность связывания с huCXCL13 и cynoCXCL13 гуманизированных 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4)(D54E) и 71F4A3-VH1VL2(D54E) сопоставима с эффективностью химерного 71F4A3, однако эффективность связывания гуманизированных 64C10G1-VH1VL2 (D53E, D107E) и 64C10G1-VH1VL3 (D53E, D107E) значительно падает по сравнению с химерным эквивалентом.

Пример 14. Эффективность блокирования полноразмерных гуманизированных IgG против CXCL13 с удаленными ПТМ

Блокирование индуцированной CXCL13 IP1-сигналикации. Для оценки эффективности блокирования указанными гуманизированными антителами продуцировали антитела 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4), 64C10G1-VH1VL2 синтетическим путем в виде гуманизированного полноразмерного IgG1 с мутантным положением D54E (**таблица 18**) и D53E, D107E (**таблица 18а**), соответственно. Блокирующую активность оценивали в анализе IP1, индуцируемом CXCL13 человека.

Результаты обобщены на **фиг. 12**, которая демонстрирует, что гуманизированные 71F4A3-VH1VL1 (Hz71F4) и 64C10G1-VH1VL2 способны эффективно блокировать IP-сигнализацию. Эффективность блокирования обоими антителами была сопоставима с эффективностью химерных 71F4A3, 64C10G1.

Пример 15. Оптимизация аффинности гуманизированных антител

Предполагалось, что определенные остатки аминокислот в областях CDR или каркасные области могут быть изменены для дополнительного улучшения или сохранения активности и/или стабильности антител. С помощью вычислительного инструмента (VectorNTI, доступен по ссылке www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo/) с применением двух разных подходов были разработаны варианты структурных, конформационных и функциональных свойств.

Согласно первому подходу выбирали мутации для нацеливания на «горячие точки» в LCDR1, HCDR2 и HCDR3. Были идентифицированы «горячие точки» в областях CDR, как показано в **таблице 18**. Как правило, CDR3 вносит максимальный вклад в связывание антигена, и тяжелая цепь важнее легкой цепи для связывания антигена. Кроме того, LCDR1 важен для связывания антигена. В первом испытании случайные мутаций были нацелены на «горячие точки» в LCDR1, HCDR2 и HCDR3. Элиминируют «горячие точки», кодирующие консервативные и погруженные аминокислоты в CDR. Остальные CDR с «горячими точками» мутированы случайным образом: HCDR2 (3 аминокислоты: 55S, 56S, 57T), HCDR3 (2 аминокислоты: 103E, 104Y), LCDR1 (3 аминокислоты: 32G, 34A, 36Y). После завершения конструирования фаговой библиотеки проводили скрининг с антигеном CXCL13. Мутированные аминокислоты, способные улучшать K_{on} , перечислены в **таблице 19**. Последовательности перспективных клонов с более высокими K_{on} для CXCL13 человека перечислены в **таблице 20**. Получали антитела с указанными последовательностями, и проводили тестирование аффинности с применением Biacore T200. Результаты приведены в **таблице 21**.

Таблица 18. Нацеливание мутаций в «горячие точки» 71F4A3 (с D54E)

Цепь антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием, нацеленные мутации выделены жирным шрифтом и двойным подчеркиванием)	SEQ ID NO:
71F4A3-VH (D54E)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE <u>INPESSTINY</u> <u>APSLKDRFTI</u> SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD <u>DYEYYAMDYW</u> GQGTTVTVSS	156
71F4A3-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN <u>TGVAWYQQKP</u> GKAPKLLIYS <u>ASYRYTGVP</u> S RFSGSGSGTD FTFTISSSLQP EDIATYYCQO <u>YYSTPLTFGG</u> GTKLEIK	138

Таблица 18а. 64C10G1-VH1VL2 с мутациями D53E и D107E

Цепь антитела	Последовательности (мутации выделены жирным шрифтом и подчеркиванием)	SEQ ID NO:
64C10G1 -VH1 (D53E, D107E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAT IS <u>E</u> GGSDAYYPDNVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY YGSgyE <u>E</u> SPMDYWGQGTlVTVSS	157
64C10G1-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYIAWYQQKPKAPKLLIYY TSTLQPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCLQYDNLYTFGGG TKLEIK	121

Таблица 19. Мутации в 71F4A3, подходящие для улучшения связывания

Остаток	Замена на:
VH-55S	A, G, R или T
VH-56S	K, T или N
VH-57T	S, W, F, L, G, Y или I
VH-103E	S, T, L, R, W или D
VH-104Y	H, T, N, V или K
VL-32G	A,
VL-34A	S, T, D,
VL-36Y	S, F,

Таблица 20. Перспективные клоны 71F4A3

Цепь антитела	Последовательности	SEQ ID NO:
71F4A3-BC1-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPEASSINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYSHYAMDYW GQGTlVTVSS	158
71F4A3-BC1-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVSWSQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	159
71F4A3-BC4-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPEAGKWN Y APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYTTYAMDYW GQGTlVTVSS	160
71F4A3-BC4-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVSWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	161
71F4A3-BE3-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESTTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYLT YAMDYW GQGTlVTVSS	162
71F4A3-BE3-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TAVDWFQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	163
71F4A3-BD12-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPETTIINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYRHYAMDYW GQGTlVTVSS	164
71F4A3-BD12-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVAFWQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	165
71F4A3-4H1-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESTLIN Y APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYRNYAMDYW GQGTlVTVSS	166
71F4A3-4H1-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVSWFQQKP	167

	GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	
71F4A3-5A4-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESTGINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYWTYAMDYW GQGTTVTVSS	168
71F4A3-5A4-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TAVSWTQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	169
71F4A3-3F12-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESNFINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYSVYAMDYW GQGTTVTVSS	170
71F4A3-3F12-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVTFWFQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	171
71F4A3-B12-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPERNYINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYDKYAMDYW GQGTTVTVSS	172
71F4A3-B12-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVTWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	173

Таблица 21. Результаты определения K_{on} для перспективных клонов

Образцы	k_a (1/Мс)
71F4-BC1	2,09E+06
71F4-BC4	3,62E+05
71F4-BE3	1,03E+06
71F4-BH2	1,44E+06
71F4-4H1	1,64E+07
71F4-5A4	6,58E+06
71F4-3F12	6,30E+06
71F4-4B12	5,36E+06
71F4-BD12	1,90E+06
H _z 71F4	3,77E+05

Согласно второму подходу проводили мутации с получением нескольких библиотек, включающих 4 разные подбиблиотеки, например, библиотек насыщающего мутагенеза путем «прогулки по CDR» для CDR L1, CDR L3, CDR H3 или CDR L2, CDR H1, CDR H2, и библиотек насыщающего мутагенеза путем мутирования трех последовательных АК для CDR H3 или CDR L3. CDR идентифицировали по методу AbM от abYsis 3 (<http://abysis.org/>), как показано в **таблице 22**. После завершения конструирования фаговых подбиблиотек проводили скрининг с антигеном CXCL13. Мутированные аминокислоты, способные улучшать K_{off} , перечислены в **таблице 23**. Последовательности перспективных клонов с меньшими K_{off} для CXCL13 человека перечислены в **таблице 24**. Получали антитела с указанными последовательностями и проводили тестирование аффинности с применением Biacore T200. Результаты приведены в **таблице 25**. Для дополнительной оптимизации антител в перспективные

клоны вводили обратные мутации последовательно по одной АК с возвращением к гуманизированному эквиваленту. Получали последовательности и синтезировали антитела. Тестировали аффинность с применением Biacore T200. Результаты показывают, что одна из обратных мутаций 005-3-18, последовательность которого приведена в **таблице 26**, дающая обратный мутант 92W → Y в легкой цепи, названный 71F4-B, значительно улучшает K_{off} , $KD(< 1 \text{ нМ})$ и блокирующую активность по сравнению с Hz71F4 и 005-3-18; данные приведены в **таблице 27**.

Таблица 22. CDR 71F4A3

Цепь антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием; нацеленные мутации выделены жирным шрифтом и двойным подчеркиванием)	SEQ ID NO:
71F4A3-VH (D54E)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE <u>INPESSTINY</u> <u>APSLKDRFTI</u> <u>SRDNAKNSLY</u> LQMNSLRAED TAVYYCAR <u>QD</u> <u>DYEYYAMDYW</u> GQGTTVTVSS	156
71F4A3-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCK <u>ASQDVN</u> <u>TGVAWYQQKP</u> GKAPKLLIYS <u>ASYRYTGVPS</u> <u>RFSGSGSGTD</u> <u>FTFTISSLQP</u> EDIATYYC <u>QQ</u> <u>YYSTPLTFGG</u> GTKLEIK	138

Таблица 23. Мутации в 71F4A3, подходящие для улучшения K_{off}

Остаток	Замена на:
VL-25A	V
VL-34A	Y
VL-91Y	G
VL-92Y	W
VH-100D	E
VH-102Y	T
VH-103E	R
VH-106A	T
VH-107M	L

Таблица 24. Последовательности перспективных клонов

Цепь антитела	Последовательности	SEQ ID NO:
005-3-18-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE <u>INPESSTINY</u> <u>APSLKDRFTI</u> <u>SRDNAKNSLY</u> LQMNSLRAED TAVYYCAR <u>QD</u> <u>DY</u> EYYTMDYW GQGTTVTVSS	174
005-3-18-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKV <u>SQDVN</u> <u>TGVAWYQQKP</u> GKAPKLLIYS <u>ASYRYTGVPS</u> <u>RFSGSGSGTD</u> <u>FTFTISSLQP</u> EDIATYYC <u>QQ</u> <u>YWSTPLTFGG</u> GTKLEIK	175
005-3-23-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE <u>INPESSTINY</u> <u>APSLKDRFTI</u> <u>SRDNAKNSLY</u> LQMNSLRAED TAVYYCAR <u>QE</u> <u>DY</u> EYYALDYW GQGTTVTVSS	176
005-3-23-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVYWYQQKP GKAPKLLIYS <u>ASYRYTGVPS</u> <u>RFSGSGSGTD</u> <u>FTFTISSLQP</u> EDIATYYC <u>QQ</u> <u>G</u> YSTPLTFGG GTKLEIK	177

005-2-45-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DTRYAMDYW GQGTTVTVSS	178
005-2-45-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	138

Таблица 25. Результаты определения K_{off} для перспективных клонов

Образец	k_d (1/c)
005-3-18	1,58E-04
005-3-23	4,03E-04
005-2-45	7,76E-04
Hz71F4	1,26E-03

Таблица 26. Последовательности перспективных клонов

Цепь антитела	Последовательности (обратная мутация W92Y выделена подчеркиванием и жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
71F4-B-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYEYTMIDYW GQGTTVTVSS	174
71F4-B -VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ <u>Y</u> YSTPLTFGG GTKLEIK	179

Таблица 27. Результаты определения аффинности и блокирования для 71F4-B

Образцы	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)	Блокирование в клетках (показатель IC_{50})
Hz71F4A3	2,50E+05	6,45E-04	2,58E-09	1,0
005-3-18	1,24E+05	1,53E-04	1,24E-09	/
71F4-B	1,83E+05	3,57E-05	1,95E-10	0,7

Для дополнительной оптимизации 71F4-B все мутации 71F4A3, подходящие для улучшения связывания (K_{on}), добавляли в 71F4-B; указанные последовательности приведены в таблице 28. Получали антитела, соответствующие указанным последовательностям, и проводили тестирование аффинности с применением Biacore T200. Результаты показали, что аффинность 71F4-B-T, 71F4-B-LT, 71F4-B-H повышалась почти на 1 log по сравнению с 71F4-B; показатели аффинности перспективных клонов приведены в таблице 29.

Таблица 28. Последовательности перспективных клонов

Цепь антитела	Последовательности	SEQ ID NO:
---------------	--------------------	------------

71F4-B-L-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYLYYTMDYW GQGTTVTVSS	180
71F4-B-L-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-T-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYETYTMDYW GQGTTVTVSS	181
71F4-B-T-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-LT-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYLYYTMDYW GQGTTVTVSS	182
71F4-B-LT-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-A-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPEASTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYEYYTMDYW GQGTTVTVSS	183
71F4-B -VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-S1-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSSINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYEYYTMDYW GQGTTVTVSS	184
71F4-B-S1-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-S2-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYSYYTMDYW GQGTTVTVSS	185
71F4-B-S2 -VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-H-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYEHYTMDYW GQGTTVTVSS	186
71F4-B-H -VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-SH-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSTINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYSHYTMDYW GQGTTVTVSS	187
71F4-B-SH-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-AS-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPEASSINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYEYYTMDYW GQGTTVTVSS	188
71F4-B-AS-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP	179

	GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	
71F4-B-SSH-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPESSSINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYSHYTMDYW GQGTTVTVSS	189
71F4-B-SSH-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179
71F4-B-ASH-VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGIDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAE INPEASSINY APSLKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQD DYSHYTMDYW GQGTTVTVSS	190
71F4-B-ASH-VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKVSQDVN TGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YYSTPLTFGG GTKLEIK	179

Таблица 29. Результаты определения аффинности

Образцы	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
71F4-B	1,83E+05	6,59E-05	3,60E-10
71F4-B-L	1,94E+05	8,58E-05	4,43E-10
71F4-B-T	2,56E+05	1,17E-05	4,56E-11
71F4-B-LT	2,35E+05	1,02E-05	4,35E-11
71F4-B-A	1,76E+05	6,82E-05	3,88E-10
71F4-B-S1	2,29E+05	9,26E-05	4,04E-10
71F4-B-S2	5,15E+05	2,68E-04	5,20E-10
71F4-B-H	1,97E+05	1,27E-05	6,47E-11
71F4-B-SH	1,92E+05	5,55E-05	2,90E-10
71F4-B-AS	2,26E+05	7,25E-05	3,21E-10
71F4-B-SSH	2,51E+05	9,46E-05	3,77E-10
71F4-B-ASH	1,76E+05	9,17E-05	5,21E-10

Пример 16. Эффективность блокирования антителами против CXCL13 с созревшей аффинностью в анализе сигнализации

Ингибирование опосредованной CXCL13 IP1-сигнализации. На основании результатов определения аффинности связывания авторы настоящего изобретения выбрали 71F4A3-B, 71F4A3-B-T, 71F4A3-B-H, 71F4A3-B-LT для изучения в функциональном анализе IP1-сигнализации. Кроме того, авторы настоящего изобретения сравнивали эффективность блокирования антитела против CXCL13 собственной разработки с эффективностью референсного антитела против CXCL13, Mab5261, которое было упомянуто в примере 9.

Как показано на **фиг. 13**, все варианты 71F4A3 с созревшей аффинностью и Hz71F4A3 могли дозозависимым образом ингибировать сигнал IP1, который был индуцирован

CXCL13. Эффективность блокирования разными вариантами 71F4A3 с созревшей аффинностью была сопоставима с Hz71F4A3, а эффективность вариантов 71F4A3 с созревшей аффинностью была значимо выше по сравнению с референсным антителом.

Пример 17. Функциональные свойства антител против CXCL13 с созревшей аффинностью в анализе миграции клеток

Блокирование миграции клеток BaF3-CXCR5 (человека) к CXCL13.

Дополнительно авторы настоящего изобретения валидировали активность указанных антител с созревшей аффинностью и референсного антитела в анализе миграции клеток линии BaF3-CXCR5, который упоминался в примере 5.

На **фиг. 14** пунктирными линиями отмечен уровень индуцированной CXCL13 миграции. При добавлении в указанную аналитическую систему антител против CXCL13, Hz71F4A3, 71F4A3-B, 71F4A3-B-T, 71F4A3-B-H и Mab6261, происходило дозозависимое ингибирование миграции клеток BaF3-CXCR5. Ингибирующая активность вариантов 71F4A3 с созревшей аффинностью была аналогична активности Hz71F4A3 в анализе миграции клеток указанной линии. При этом ингибирующая активность всех вариантов 71F4A3 с созревшей аффинностью была существенно выше по сравнению с активностью референсного антитела Mab5261.

Ингибирование миграции первичных клеток миндалин человека к CXCL13. Кроме того, авторы настоящего изобретения также изучали блокирующую функцию антител против CXCL13 с созревшей аффинностью в анализе миграции первичных клеток миндалин человека.

Как показано на **фиг. 15**, по сравнению с состоянием при обработке IgG все антитела 71F4A3 с созревшей аффинностью, 71F4A3-B, 71F4A3-B-T, 71F4A3-B-H, были способны ингибировать хемотаксис первичных клеток миндалин человека, индуцированный CXCL13, дозозависимым образом. При этом активность ингибирования для антител 71F4A3 с созревшей аффинностью была сопоставима с активностью Hz71F4A3 в указанном анализе с первичными клетками человека.

* * *

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными описанными вариантами реализации, предназначенными исключительно для иллюстрации отдельных аспектов

настоящего изобретения, и в объем настоящего изобретения входят любые функционально эквивалентные композиции или способы. Специалистам в данной области техники будет понятно, что различные модификации и варианты способов и композиций согласно настоящему описанию могут быть реализованы без отступления от существа или объема настоящего изобретения. Соответственно, предполагается, что настоящим изобретением охвачены модификации и варианты настоящего изобретения при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения, а также их эквиваленты.

Все публикации и патентные заявки, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылок в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка была конкретным индивидуальным образом указана как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с С-Х-С мотивом) - лиганда 13 (CXCL13) человека, причем указанное антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где:

HCDR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:127 (RYWMS);

HCDR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:128 (EINPDSSTINYAPSLKD), SEQ ID NO:129 (EINPESSTINYAPSLKD), SEQ ID NO:340 (EINPEASSINYAPSLKD), SEQ ID NO:343, (EINPEAGKWNYPAPSLKD), SEQ ID NO:347 (EINPETTIINYAPSLKD), SEQ ID NO:349 (EINPESTLINYPAPSLKD), SEQ ID NO:351, INPESTGINYPAPSLKD), SEQ ID NO:354 (EINPESNFINYAPSLKD), SEQ ID NO:357 (EINPERNYINYAPSLKD), SEQ ID NO:369 (EINPEASTINYAPSLKD) или SEQ ID NO:370 (EINPESSSINYAPSLKD);

HCDR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:130 (QDDYEYYAMDY), SEQ ID NO:341 (QDDYSHYAMDY), SEQ ID NO:344 (QDDYTTYAMDY), SEQ ID NO:345 (QDDYLTYYAMDY), SEQ ID NO:348 (QDDYRHYAMDY), SEQ ID NO:350 (QDDYRNYAMDY), SEQ ID NO:352 (QDDYWTYYAMDY), SEQ ID NO:355 (QDDYSVYAMDY), SEQ ID NO:358 (QDDYDKYAMDY), SEQ ID NO:359 (QDDYEYYTMDY), SEQ ID NO:362 (QEDYEYYALDY), SEQ ID NO:365 (QDDTRYAMDY), SEQ ID NO:366 (QDDYLYYTMDY), SEQ ID NO:367 (QDDYETYTMDY), SEQ ID NO:368 (QDDYLTYYTMDY), SEQ ID NO:371 (QDDYSYYTMDY), SEQ ID NO:372 (QDDYEHYTMDY) или SEQ ID NO:373 (QDDYSHYTMDY);

LCDR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:131 (KASQDVNTGVA), SEQ ID NO:342 (KASQDVNTGVS), SEQ ID NO:346 (KASQDVNTAVD), SEQ ID NO:353 (KASQDVNTAVS), SEQ ID NO:356

(KASQDVNTGVT), SEQ ID NO:360 (KVSQDVNTGVA) или SEQ ID NO:363 (KASQDVNTGVY);

LCDR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:132 (SASYRYT);
и

LCDR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:133 (QQYYSTPLT), SEQ ID NO:361 (QQYWSTPLT) или SEQ ID NO:364 (QQGYSTPLT).

2. Антитело или его фрагмент по п. 1, характеризующийся тем, что HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 367, 360, 132 и 133, соответственно.

3. Антитело или его фрагмент по п. 2, характеризующееся (характеризующийся) тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:181, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:181, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:179.

4. Антитело или его фрагмент по п. 3, гуманизированное(ый) и характеризующееся(ийся) тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит одну или более обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 5Q, 47I, 48G и 85V, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций, или тем, что указанная переменная область легкой цепи содержит мутацию 78V в соответствии с нумерацией по Kabat.

5. Антитело или его фрагмент по п. 2, характеризующееся (характеризующийся) тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:181, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179.

6. Антитело или его фрагмент по п. 1, характеризующийся тем, что указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 359, 360, 132 и 133, соответственно.

7. Антитело или его фрагмент по п. 6, характеризующееся (характеризующийся) тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:174, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:174, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:179, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:179.

8. Антитело или его фрагмент по п. 1, характеризующийся тем, что указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 359, 360, 132 и 361, соответственно.

9. Антитело или его фрагмент по п. 8, характеризующееся (характеризующийся) тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:174, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:174, а переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:175, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:175.

10. Антитело или его фрагмент по п. 1, характеризующийся тем, что указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 129, 130, 131, 132 и 133, соответственно.

11. Антитело или его фрагмент по п. 10, характеризующееся (характеризующийся) тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:156, или последовательность аминокислот, по меньшей мере

на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:156, а вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:138.

12. Антитело или его фрагмент по п. 1, характеризующийся тем, что указанные HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCD2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO:127, 128, 130, 131, 132 и 133, соответственно.

13. Антитело или его фрагмент по п. 12, характеризующееся (характеризующийся) тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:134, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:134, а вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:138.

14. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 6–13, гуманизированное(ый) и характеризующееся(ийся) тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит одну или более обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 5Q, 47I, 48G и 85V, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций, или тем, что указанная вариабельная область легкой цепи содержит мутацию 78V в соответствии с нумерацией по Kabat.

15. Антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с C-X-C мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека, которое (который) содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

где:

набор HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбран из таблицы А или В, или наборов CDR, взятых из таблицы А или В с одним (одной), двумя или тремя добавлениями, делециями и/или заменами аминокислот в одной или более областях CDR, и

набор LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбраны из таблицы А или В, или наборов CDR, взятых из таблицы А или В с одним (одной), двумя или тремя добавлениями, делециями и/или заменами аминокислот в одной или более областях CDR.

16. Антитело или его фрагмент со специфичностью в отношении белка хемокина (с С-Х-С мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека, характеризующееся(ийся) тем, что он(о) может связываться с одним или более остатками аминокислот, выбранными из группы, состоящей из F20, P22, R24 и F25 белка CXCL13.

17. Антитело или его фрагмент по п. 16, который может связываться с F20 и P22, F20 и R24, F20 и F25, P22 и R24, P22 и F25, или R24 и F25 белка CXCL13.

18. Антитело или его фрагмент по п. 17, который может связываться с F20, P22 и R24; F20, P22 и F25; F20, R24 и F25; или P22, R24 и F25 белка CXCL13.

19. Антитело или его фрагмент по п. 17, который может связываться с F20, P22, R24 и F25 белка CXCL13.

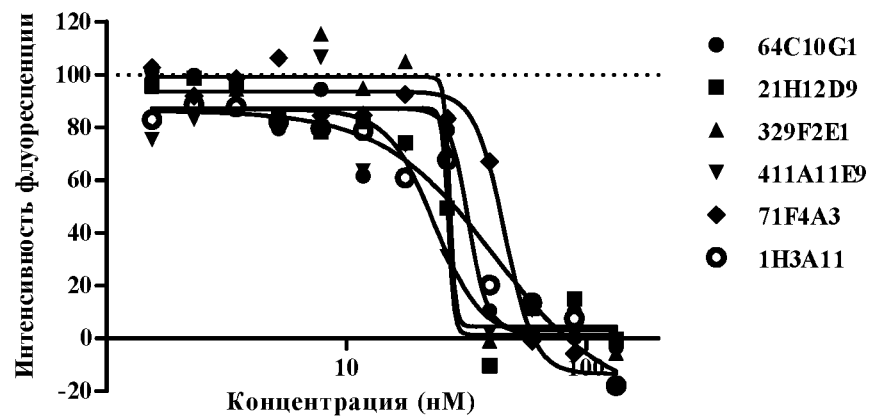
20. Антитело или его фрагмент по п. 17, которое (который) может дополнительно связываться с белком CXCL13 яванского макака.

21. Биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть, обладающую специфичностью в отношении белка хемокина (с С-Х-С мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека, и вторую антигенсвязывающую часть, обладающую специфичностью в отношении белка фактора активации В-клеток человека (BAFF), причем указанная первая антигенсвязывающая часть содержит фрагмент антитела по любому из пп. 1–20.

22. Биспецифическое антитело по п. 21, имеющее формат, включающий полное антитело, слитое с двумя одноцепочечными фрагментами (scFv) или с двумя Fab-фрагментами.
23. Биспецифическое антитело по п. 21 или 22, характеризующееся тем, что указанная вторая часть содержит антигенсвязывающий фрагмент белимумаба.
24. Композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп. 1–20 или биспецифическое антитело по любому из пп. 21–23 и фармацевтически приемлемый носитель.
25. Выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по любому из пп. 1–20 или биспецифическое антитело по любому из пп. 21–23.
26. Полинуклеотид, кодирующий одну или более цепей антитела или его фрагмента по любому из пп. 1–20 или биспецифического антитела по любому из пп. 21–23.
27. Способ подавления иммунного ответа или лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1–20 или биспецифического антитела по любому из пп. 21–23.
28. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп. 1–20 или биспецифического антитела по любому из пп. 21–23 для получения лекарственного средства для подавления иммунного ответа или лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом пациента.
29. Способ по п. 27 или применение по п. 28 для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения.

30. Способ по п. 27 или применение по п. 28, характеризующиеся тем, что указанное аутоиммунное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из диабета I типа, ревматоидного артрита (РА), псориаза/псориатического артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки (волчанки), воспалительного заболевания кишечника, болезни Аддисона, болезни Грейвса, синдрома Шегрена, тиреоидита Хашимото, тяжелой миастении, васкулита, пернициозной анемии и целиакии.
31. Способ по п. 27 или применение по п. 28, характеризующиеся тем, что указанное аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой синдром Шегрена.
32. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1–20.
33. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп. 1–20 для получения лекарственного средства для лечения рака у нуждающегося в этом пациента.
34. Способ детекции экспрессии белка хемокина (с C-X-C-мотивом)-лиганда 13 (CXCL13) человека в образце, включающий приведение указанного образца в контакт с антителом или его фрагментом по любому из пп. 1–20, и детекцию связывания, которое указывает на экспрессию CXCL13 в указанном образце.

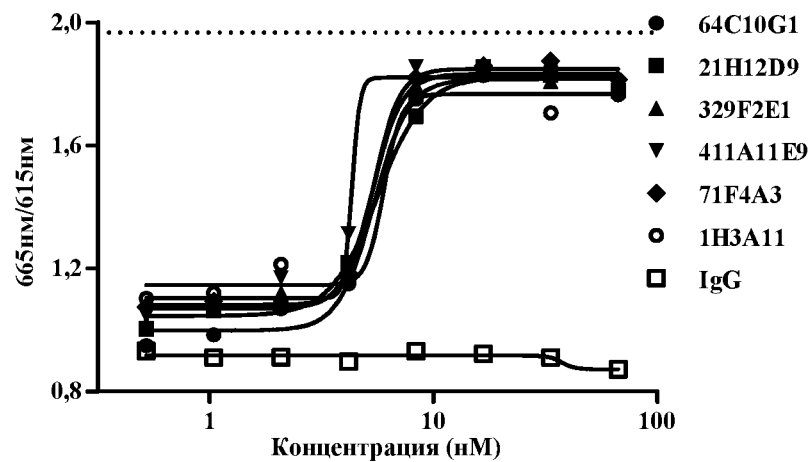
Индукированный rhCXCL13 поток кальция в клетках CHO-K1-CXCR5



	64C10G1	21H12D9	329F2E1	411A11E9	71F4A3	1H3A11
IC50	32,09	~ 26,52	~ 26,95	23,18	45,63	41,27

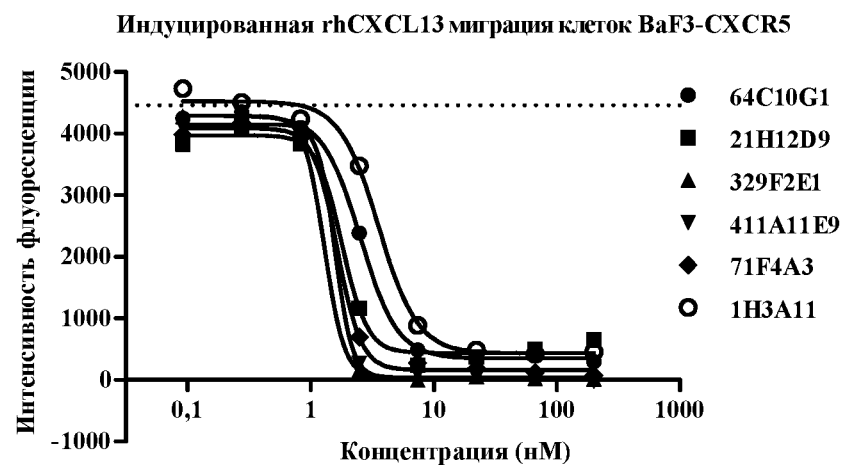
Фиг. 1

Индукированная rhCXCL13 IP1-сигнализация в клетках CHO-K1-CXCR5



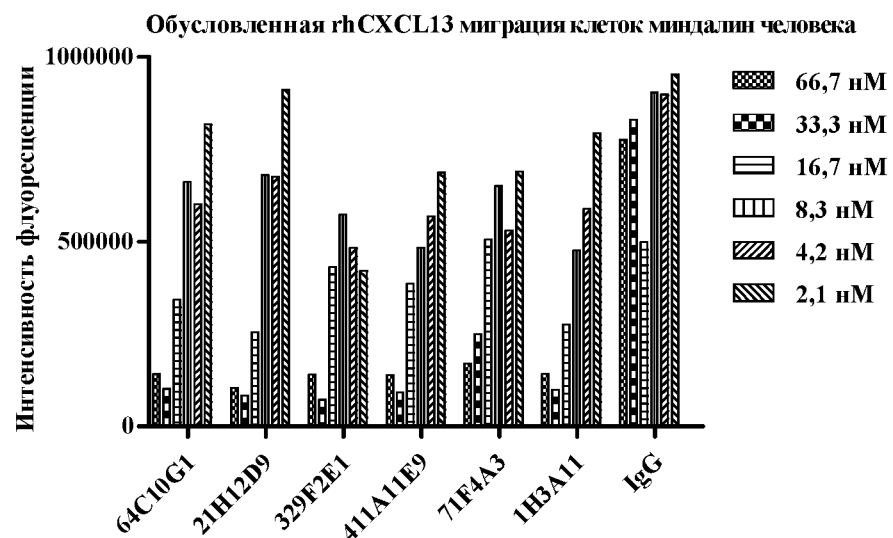
	64C10G1	21H12D9	329F2E1	411A11E9	71F4A3	1H3A11
IC50	5,393	5,607	5,319	~ 4,320	5,374	5,988

Фиг. 2



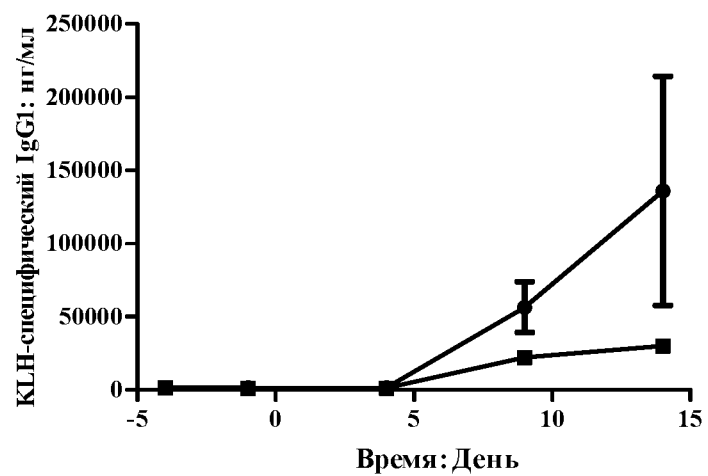
	64C10G1	21H12D9	329F2E1	411A11E9	71F4A3	1H3A11
IC50	2,520	1,797	1,295	1,583	1,647	3,575

Фиг. 3

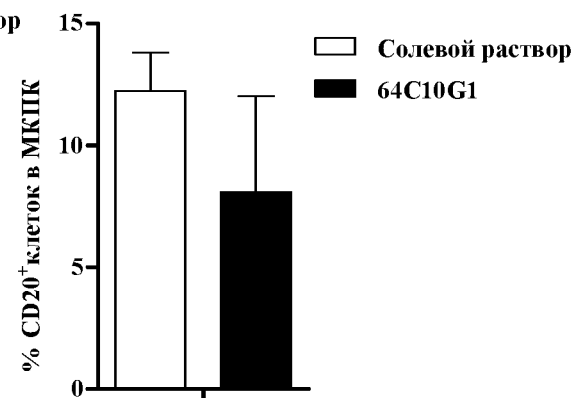


Фиг. 4

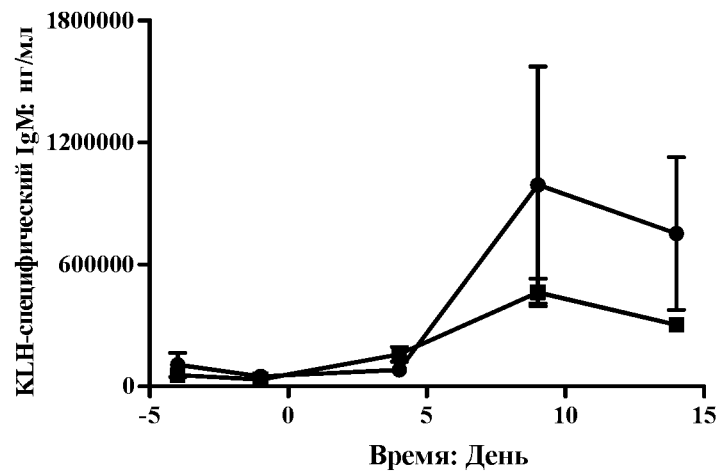
А



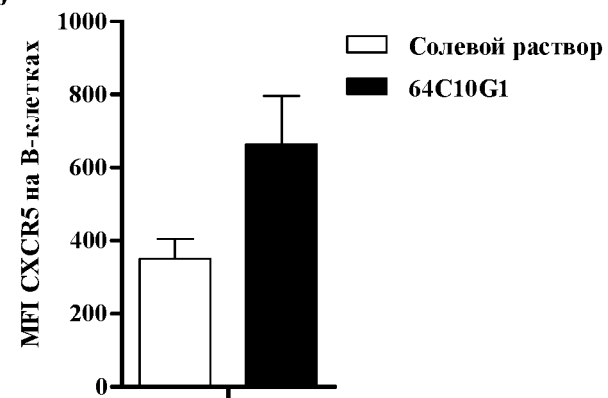
С



В

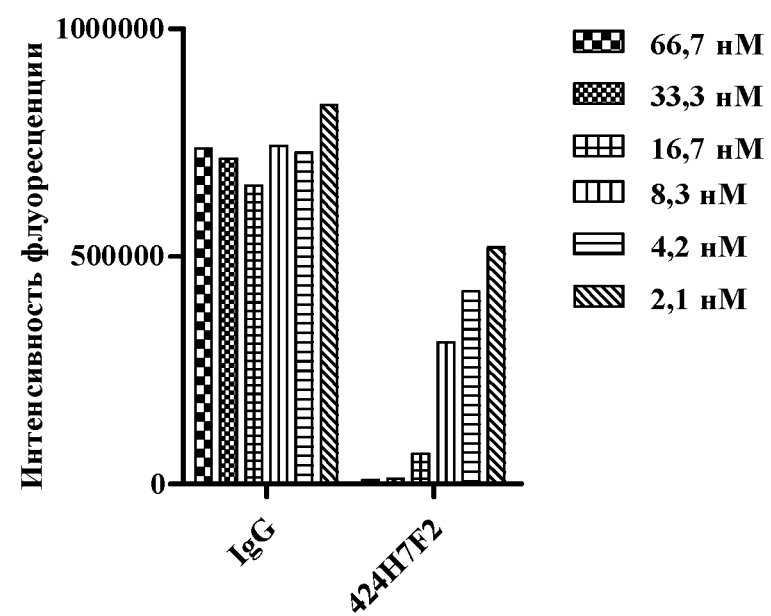


Д

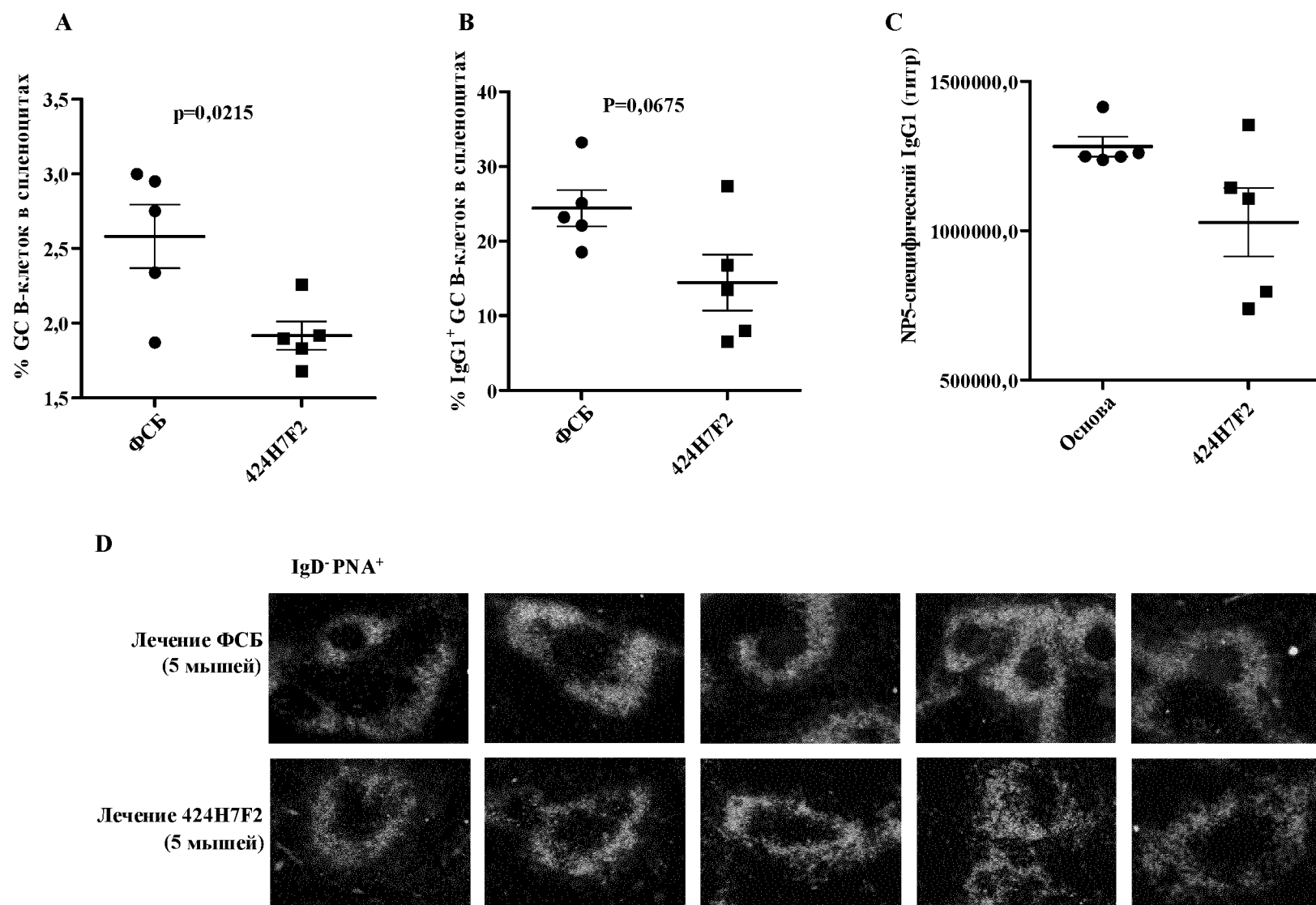


Фиг. 5

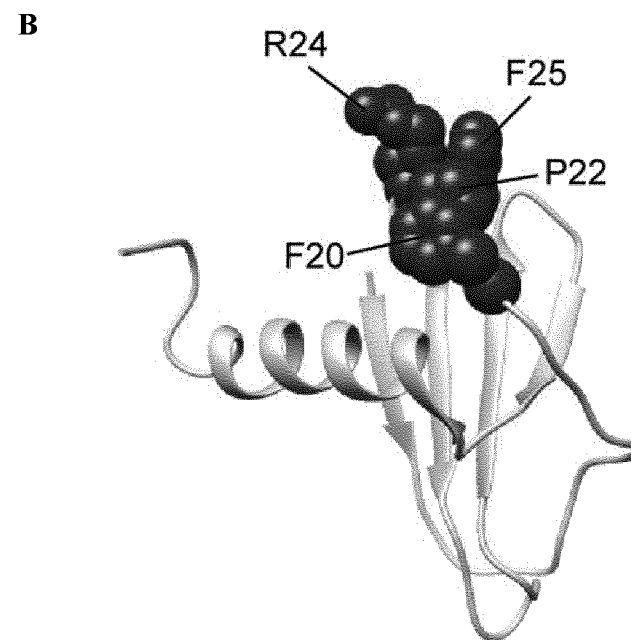
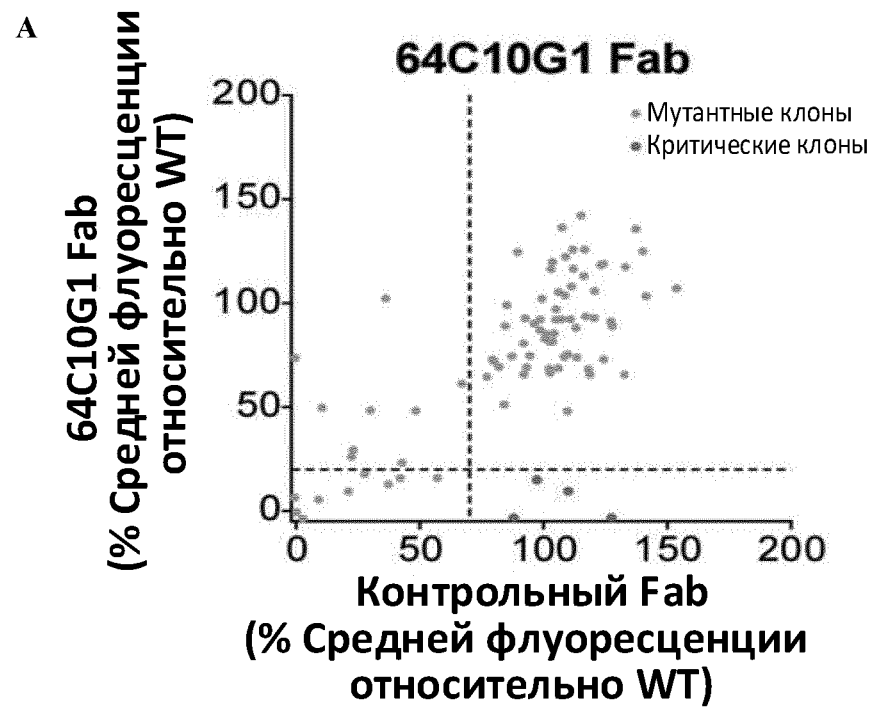
Индукцированная gmCXCL13 миграция спленоцитов мыши



Фиг. 6

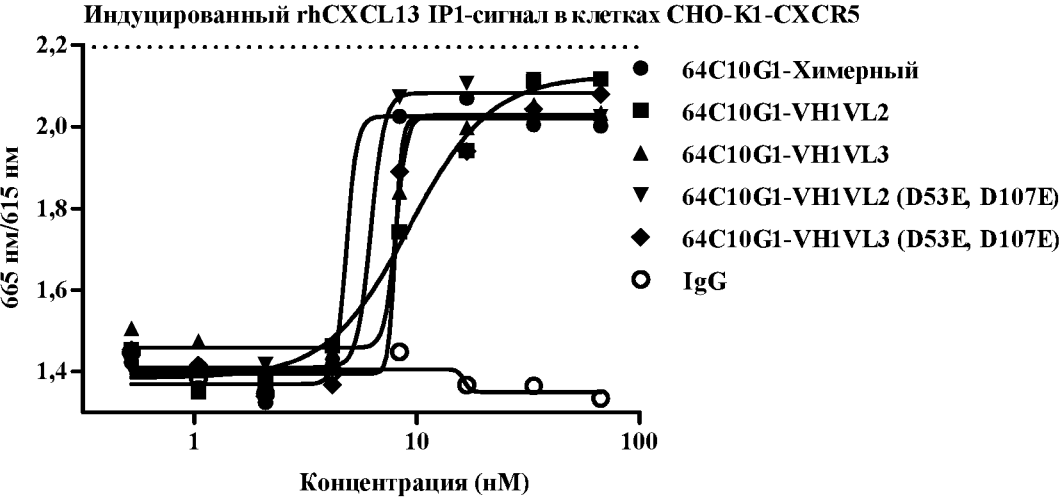


Фиг. 7



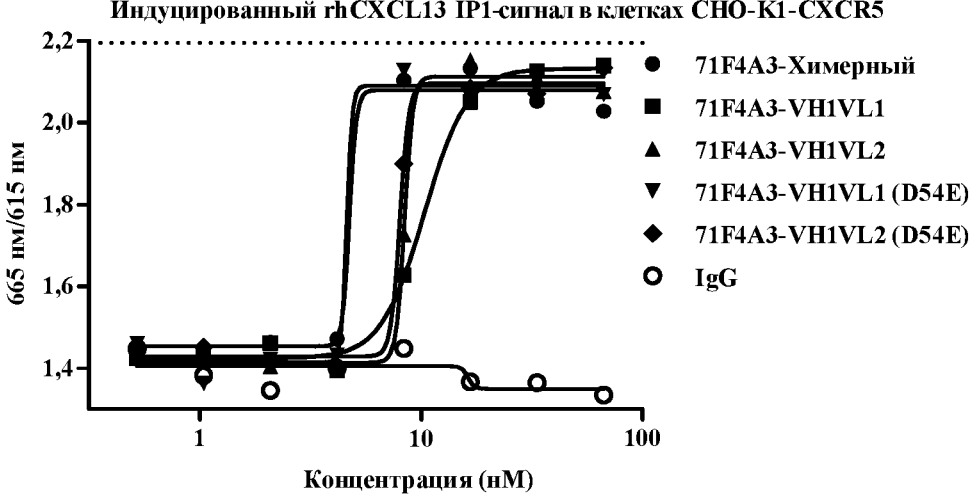
Фиг. 8

А



	64C10G1-Химерный	64C10G1-VH1VL2	64C10G1-VH1VL3	64C10G1-VH1VL2 (D53E, D107E)	64C10G1-VH1VL3 (D53E, D107E)
IC50	~ 4,804	9,234	~ 8,007	6,200	~ 7,965

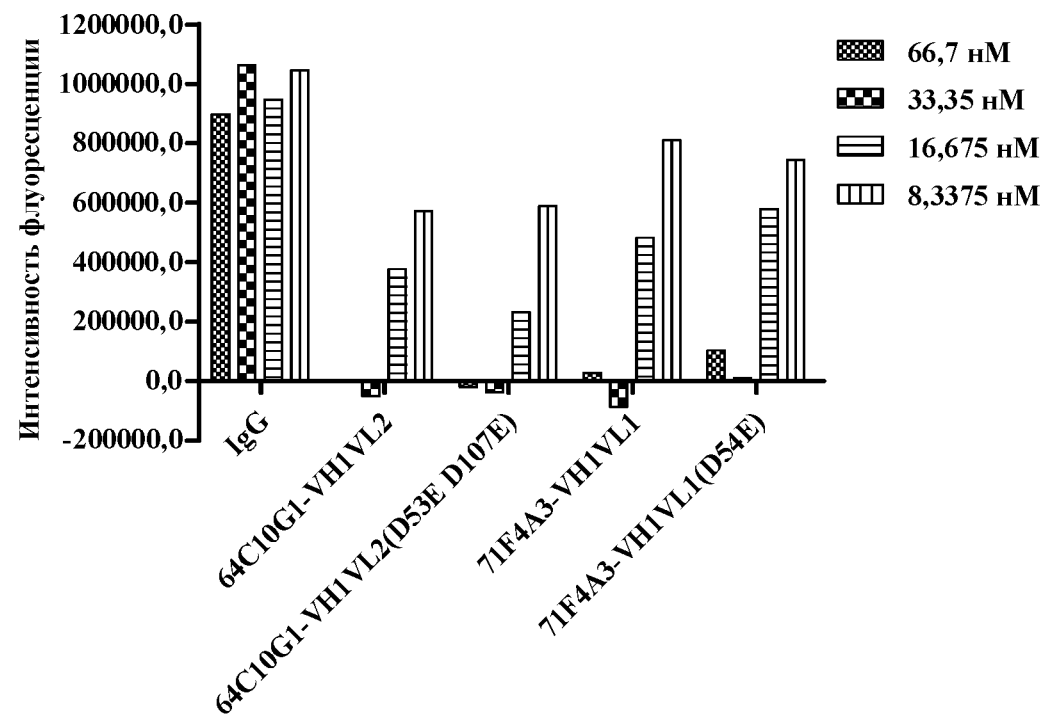
В



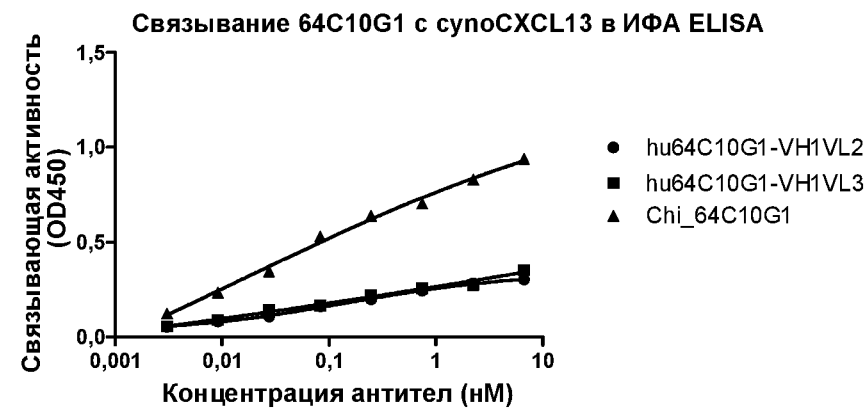
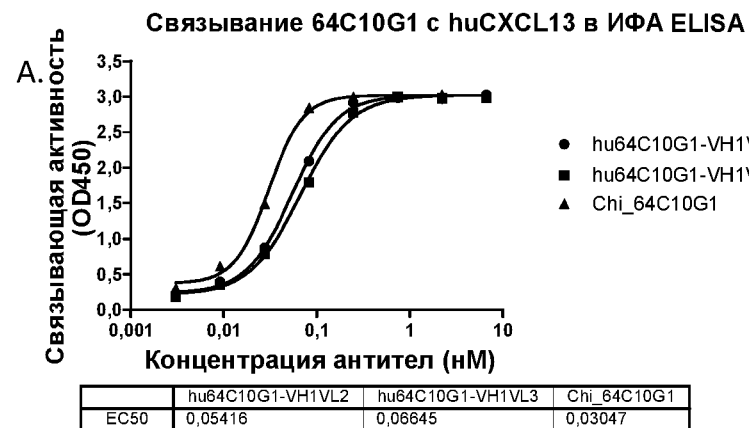
	71F4A3-Химерный	71F4A3-VH1VL1	71F4A3-VH1VL2	71F4A3-VH1VL1(D54E)	71F4A3-VH1VL2(D54E)
IC50	~ 4,737	10,33	~ 8,414	~ 4,609	~ 8,008

Фиг. 9

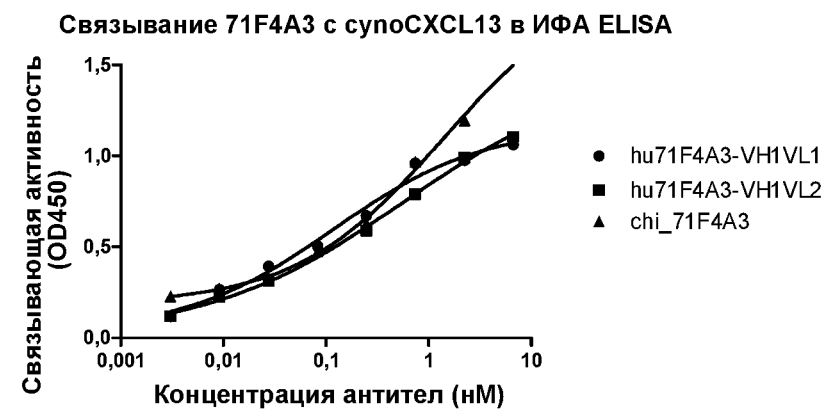
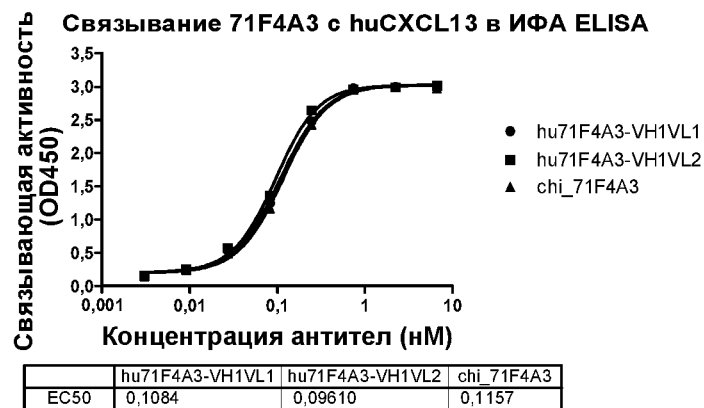
Обусловленная rhCXCL13 миграция клеток миндалин человека



Фиг. 10

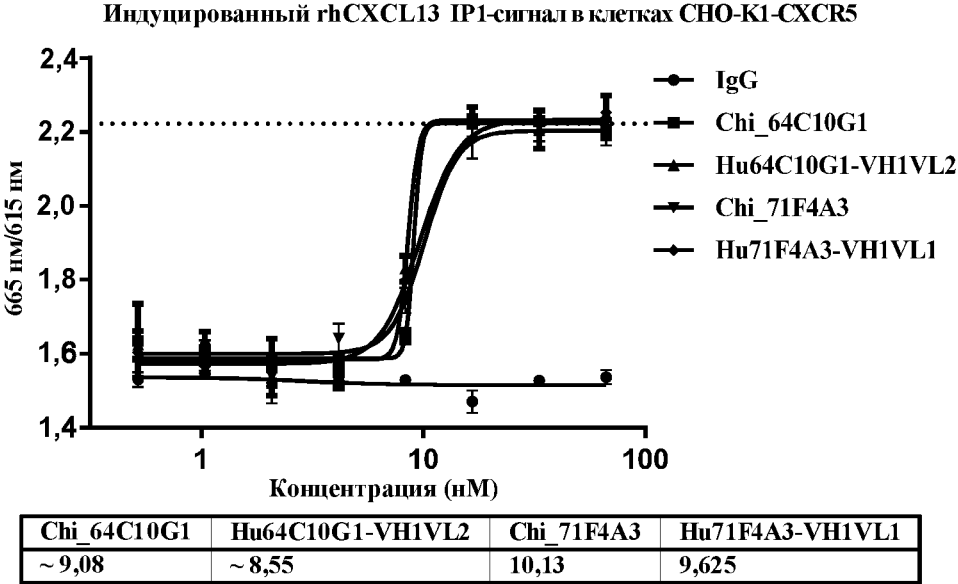


В.

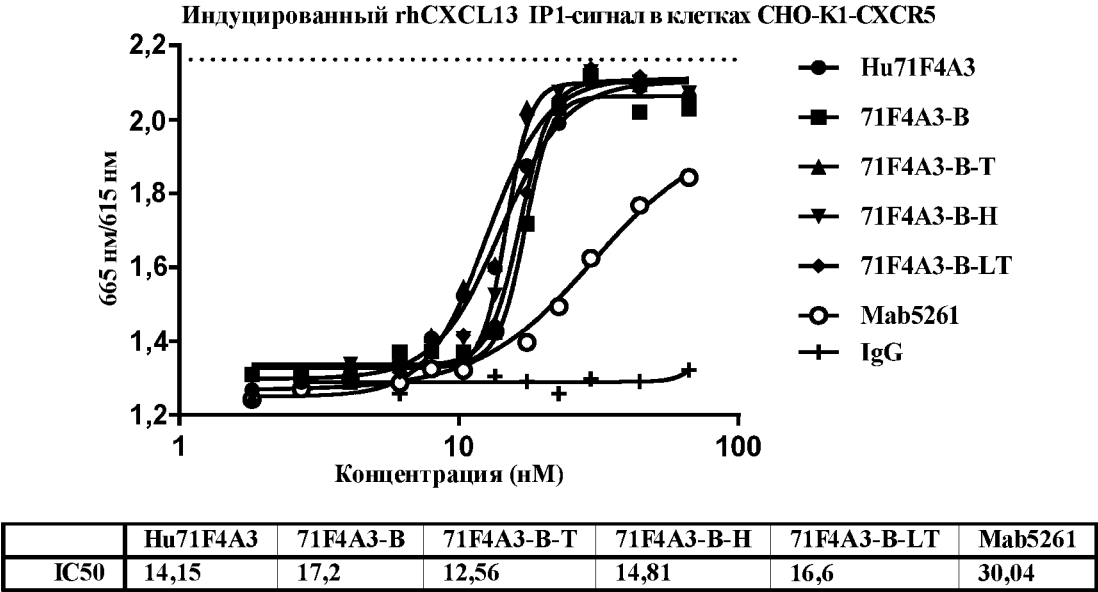


Фиг. 11

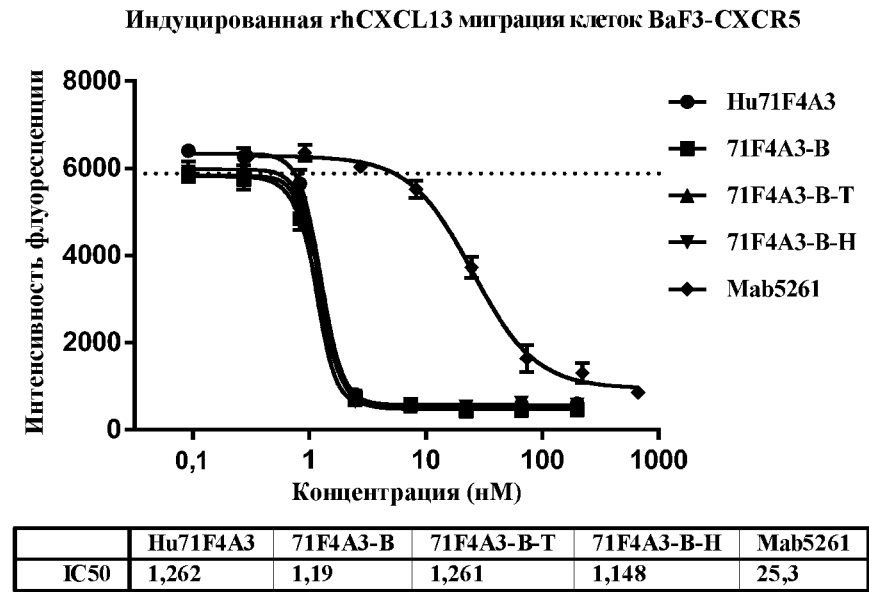
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

