

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092593 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.12

(51) Int. Cl. A61P 3/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.29

(54) БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ КАННАБИНОИДНЫЙ РЕЦЕПТОР 1-ГО ТИПА (CB1), И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/664,882

(32) 2018.04.30

(33) US

(86) PCT/IB2019/000503

(87) WO 2019/211665 2019.11.07

(71) Заявитель:
ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)

(72) Изобретатель:

Банерджи Антара, Фанхуль Андреа,
Хой Роберт Дж., Заксен Кейси, Суслов
Николай (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложены выделенные, сконструированные, не встречающиеся в природе связывающие CB1 белки, включая антитела против CB1 или их антигенсвязывающие фрагменты. Связывающие CB1 белки находят применение в лечении и диагностике опосредованных CB1 патологических состояний, заболеваний и нарушений.

A1

202092593

202092593

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565493EA/055

БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ КАННАБИНОИДНЫЙ РЕЦЕПТОР 1-ГО ТИПА (CB1), И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США с № 62/664882, поданной 30 апреля 2018 г., описание которой полностью включено в данный документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к белкам, связывающим каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1), и их применениям.

Включение в описание изобретения сведений путем ссылки

Содержание всех процитированных ссылок (включая литературные ссылки, патенты, заявки на патенты и веб-сайты), которые могут цитироваться в этой заявке, явным образом включены в данное описание посредством ссылки во всей их полноте для любых целей, как и ссылки, цитируемые в ней. В описании будут использоваться, если не указано иное, традиционные методы иммунологии, молекулярной биологии, клеточной биологии, разработки лекарственных средств и доставки лекарственных средств, которые хорошо известны в данной области техники.

Уровень техники

Каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) представляет собой 7-трансмембранный рецептор клеточной мембраны в суперсемействе связанных с G-белком рецепторов, экспрессируемый в основном в головном мозге, а также периферически в легких, печени, почках и жировой ткани. CB1 активируется каннабиноидами, вырабатываемыми естественным образом внутри организма, называемыми эндоканнабиноидами (например, эйкозиноидами) или каннабиноидами, введенными в организм (например, каннабис), или родственными синтетическими соединениями. Каннабиноиды обратимо и стереоселективно связываются с CB1. После включения CB1 активируются множественные внутриклеточные пути передачи сигналов, что приводит к ингибированию аденилатциклазы и активации митоген-активируемой протеинкиназы (MAP), ингибированию пресинаптических кальциевых каналов N- и P/Q-типов и калиевых каналов выходящего выпрямления D- типа и активации калиевых каналов входящего выпрямления и выходящего выпрямления A-типа. Считается, что экспрессия CB1 модулирует высвобождение нейромедиаторов таким образом, чтобы предотвращать развитие чрезмерной нейрональной активности, уменьшая боль и другие воспалительные симптомы, а также модулируя потребление пищи.

Активность aberrантных CB1 связана с рядом заболеваний, включая ожирение и связанные нарушения, такие как дислипидемия, диабет, фиброз, заболевания печени, такие как стеатоз печени, заболевания почек, сердечно-сосудистые заболевания и рак.

Синдром Прадера-Вилли (СПВ) представляет собой генетическое заболевание,

вызываемое потерей определенных отцовских генов, которое характеризуется ожирением, медленным развитием диабета 2-го типа и мышечной слабостью. СВ-1 был утвержден в качестве мишени для лечения СПВ с помощью обратного агониста римонабанта (Motaghedi et al. (2011) *Eur. J. Med. Genet.* 54: 14-18). Римонабант (также называемый SR141716, Акомплия и Зимульти) был анорексическим лекарством от ожирения, разработанным и выпущенным Санофи-Авентис в качестве перорального антагониста центрального СВ1. Продукт был показан для лечения пациентов с ожирением и избыточным весом с сопутствующими факторами риска, такими как диабет 2-го типа или дислипидемия, в комбинации с диетой и упражнениями. В июне 2006 года препарат был одобрен для лечения ожирения ЕМЕА. В 2008 году Санофи-Авентис прекратила разработку и продажу препарата по всем показаниям из-за риска серьезных психических проблем, включая суицидальные мысли. В январе 2009 года Европейская комиссия отозвала разрешение на продажу препарата.

Другой обратный агонист, таранабант (МК-0364), был исследован компанией Merck, но его клинические испытания фазы 3 были остановлены из-за высокого уровня побочных эффектов, включая депрессию и тревогу. Несколько других обратных агонистов СВ1 (например, АМ251, АМ1387 и АМ4113) и антагонистов (например, каннабигерол, ибипинабант, отенабант, суринабант, тетрагидроканнабиварин и виродамин) были изучены, но они либо находятся на ранних стадиях исследования, либо были отнесены к исследованиям без участия человека из-за побочных эффектов со стороны ЦНС.

Разрабатывается ряд обратных агонистов/антагонистов СВ-1, которые нацелены в первую очередь на периферически экспрессируемые СВ1, путем ограничения их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Например, ТМ-38837 представляет собой обратный агонист/антагонист СВ1 в фазе 1, который разрабатывается 7ТМ Pharma A/S для лечения ожирения и метаболических нарушений. Еще один тихий селективный антагонист периферического действия, которого еще нет в клинической практике, представляет собой АМ6545. Периферический селективный антагонизм СВ-1 может быть более безопасным и эффективным способом нацеливания на периферическое эндоканнабиноидное действие в ряде тканей: (1) печень - уменьшение липогенеза, накопления жира и секреции глюкозы; (2) мышцы - увеличение поглощения и окисления глюкозы; (3) адипоциты - уменьшение липогенеза и накопления жира; снижение синтеза адипонектина; и (4) желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) - усиление насыщения, транзита по ЖКТ и абсорбции (Kloet and Woods (2009) *Endocrinol.* 150: 2531-2536).

Биологические молекулы, такие как антитела и родственные связывающие белки, обеспечивают потенциально более безопасный и эффективный способ доставки терапевтического препарата и предотвращения поражения ЦНС и побочных эффектов. Как правило, только около 0,1% циркулирующих антител пересекает интактный ГЭБ (Poduslo et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5705-5709; Yu and Watts (2013) *Neurotherapeut.* 10: 459-472). Следовательно, по сути низкое воздействие функционального биологического препарата против СВ1 на ЦНС дает возможность исключительно

периферически воздействовать на СВ-1, тем самым ограничивая нежелательные явления, обусловленные фармакологией малых молекул в ЦНС.

Антитела к СВ1 недавно были описаны в данной области техники, но их преимущества в клинической практике неизвестны. См. патентные публикации США №№ 20170210797 и 20160145333.

Таким образом, остается необходимость идентифицировать безопасные и эффективные обратные агонисты или антагонисты против СВ1 с периферической ограничением, которые не проникают в значительной степени через ГЭБ, чтобы избежать нежелательных фармакологических эффектов вовлечения СВ1 в мозг.

Сущность изобретения

В изобретении предложены связывающие белки, которые связывают каннабиноидный рецептор 1-го типа (СВ1), такие как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полезные при лечении и диагностике заболеваний.

Предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (СВ1) (SEQ ID NO: 1), причем связывающий белок содержит шесть определяющих комплементарность областей (CDR): CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность G-Y-T-F-T-D-Y-W (остатки 26-33 SEQ ID NO: 329) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, причем замена G в положении 1 представляет собой S; замена T в положении 3 представляет собой E; замена T в положении 5 представляет собой S или N; замена D в положении 6 представляет собой R или Y; замена Y в положении 7 представляет собой H; и замена W в положении 8 представляет собой A или N; CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность I-Y-P-Y-D-G-D-T (остатки 51-58 SEQ ID NO: 329) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, при этом замена I в положении 1 представляет собой F; замена Y в положении 2 представляет собой D, S или T; замена P в положении 3 представляет собой T; замена Y в положении 4 представляет собой G, D или S; замена D в положении 5 представляет собой Y или S; замена G в положении 6 представляет собой S; замена D в положении 7 представляет собой E, G или R; и замена T в положении 8 представляет собой A, S или I; CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность A-R-G-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-W-X₁₀-X₁₁-Y (остатки 98-113 SEQ ID NO: 329) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, причем замена A в положении 1 представляет собой S; замена G в положении 3 представляет собой S; X₁ в положении 4 представляет собой Q, Y, K, R или G или отсутствует; X₂ в положении 5 представляет собой E, Y, L или G или отсутствует; X₃ в положении 6 представляет собой Y или P или отсутствует; X₄ в положении 7 представляет собой Y, R или E или отсутствует; X₅ в положении 8 представляет собой G или отсутствует; X₆ в положении 9 представляет собой T или

отсутствует; X_7 в положении 10 представляет собой N или D или отсутствует; X_8 в положении 11 представляет собой Y, N, A или G или отсутствует; X_9 в положении 12 представляет собой N, Y, S, A или R или отсутствует; замена W в положении 13 представляет собой Y, A или P; X_{10} в положении 14 представляет собой L, M, F или G или отсутствует; X_{11} в положении 15 представляет собой P, D, A или T или отсутствует; замена Y в положении 16 представляет собой V; CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность Q-X1-I-S-S-X2-Y (остатки 27-33 SEQ ID NO: 330) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, при этом замена Q в положении 1 представляет собой S или E; X_1 в положении 2 представляет собой E, S, T, N, G или R; замена I в положении 3 представляет собой V; замена S в положении 4 представляет собой A, R или G; замена S в положении 5 представляет собой G, N или T; X_2 в положении 6 представляет собой S, N, пептид F-R-Y-S или отсутствует; и замена Y в положении 7 представляет собой F, D или N; CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность: X_1 -T-S (остатки 51-53 SEQ ID NO: 330) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, где X_1 в положении 1 представляет собой A, Y, G, R, D или S; замена T в положении 2 представляет собой A; замена S в положении 3 представляет собой R; и CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность: Q-Q-Y- X_1 -S- X_2 -P-Y-T (остатки 91-99 SEQ ID NO: 330) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, причем замена Q в положении 1 представляет собой L или H; замена Q в положении 2 представляет собой H; замена Y в положении 3 представляет собой S или G; X_1 в положении 4 представляет собой S, W, H, Y, N или I; замена S в положении 5 представляет собой E, R, G, T или N; X_2 в положении 6 представляет собой Y, I, S, T, L или W; и замена Y в положении 8 представляет собой P, L, F или отсутствует; и при этом указанная замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка не ингибирует способность указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CB1 человека.

В таблицах 5 и 6 представлены иллюстративные антитела против CB1 и их функциональные антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению.

Предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) (SEQ ID NO: 1), причем антитело содержит CDR последовательности переменного домена тяжелой цепи (VH) и CDR последовательности переменной области легкой цепи (VL), причем последовательность домена VH выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126, 138, 150, 162, 174, 186, 198, 210, 222, 234, 246, 258, 270, 282, 294, 306 и 318, и/или причем домен VL выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312 и 324.

Предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое

связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) (SEQ ID NO: 1), причем указанное антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и последовательность вариабельного домена легкой цепи (VL), при этом последовательность домена VH выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126, 138, 150, 162, 174, 186, 198, 210, 222, 234, 246, 258, 270, 282, 294, 306 и 318, и/или причем домен VL выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312 и 324.

В варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепей пары VH/VL, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/24, 30/36, 42/48, 54/60, 66/72, 78/84, 90/96, 102/108, 114/120, 126/132, 138/144, 150/156, 162/168, 174/180, 186/192, 198/204, 210/216, 222/228, 234/240, 246/252, 258/264, 270/276, 282/288, 294/300, 306/312 и 318/324.

В варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару VH/VL, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 18/24, 30/36, 42/48, 54/60, 66/72, 78/84, 90/96, 102/108, 114/120, 126/132, 138/144, 150/156, 162/168, 174/180, 186/192, 198/204, 210/216, 222/228, 234/240, 246/252, 258/264, 270/276, 282/288, 294/300, 306/312 и 318/324.

В варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор HCDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), выбранный из группы, состоящей из (20, 21, 22); (32, 33, 34); (44, 45, 46); (56, 57, 58); (68, 69, 70); (80, 81, 82); (92, 93, 94); (104, 105, 106); (116, 117, 118); (128, 129, 130); (140, 141, 142); (152, 153, 154); (164, 165, 166); (176, 177, 178); (188, 189, 190); (200, 201, 202); (212, 213, 214); (224, 225, 226); (236, 237, 238); (248, 249, 250); (260, 261, 262); (272, 273, 274); (284, 285, 286); (296, 297, 298); (308, 309, 310); и (320, 321, 322), и набор LCDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), выбранный из группы, состоящей из (26, 27, 28); (38, 39, 40); (50, 51, 52); (62, 63, 64); (74, 75, 76); (86, 87, 88); (98, 99, 100); (110, 111, 112); (122, 123, 124); (134, 135, 136); (146, 147, 148); (158, 159, 160); (170, 171, 172); (182, 183, 184); (194, 195, 196); (206, 207, 208); (218, 219, 220); (230, 231, 232); (242, 243, 244); (254, 255, 256); (266, 267, 268); (278, 279, 280); (290, 291, 292); (302, 303, 304); (314, 315, 316); и (326, 327, 328).

В варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару (набор HCDR/набор LCDR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: (20, 21, 22/ 26, 27, 28); (32, 33, 34/ 38, 39, 40); (44, 45, 46/ 50, 51, 52); (56, 57, 58/ 62, 63, 64); (68, 69, 70/ 74, 75, 76); (80, 81, 82/ 86, 87, 88); (92, 93, 94/ 98, 99, 100); (104, 105, 106/ 110, 111, 112); (116, 117, 118/ 122, 123, 124); (128, 129, 130/ 134, 135, 136); (140, 141, 142/ 146, 147, 148); (152, 153, 154/ 158, 159, 160); (164, 165, 166/ 170, 171, 172); (176, 177, 178/ 182, 183, 184); (188, 189, 190/ 194, 195, 196); (200, 201, 202/ 206, 207, 208); (212, 213, 214/ 218, 219, 220); (224, 225, 226/ 230, 231, 232); (236, 237, 238/ 242, 243, 244); (248, 249, 250/ 254, 255, 256); (260, 261, 262/ 266, 267, 268); (272, 273, 274/ 278, 279, 280); (284, 285, 286/ 290, 291, 292); (296, 297, 298/ 302, 303, 304); (308, 309, 310/ 314, 315, 316); и (320, 321,

322/326, 327, 328).

В варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару HC/LC, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17/23, 29/35, 41/47, 53/59, 65/71, 77/83, 89/95, 101/107, 113/119, 125/131, 137/143, 149/155, 161/167, 173/179, 185/191, 197/203, 209/215, 221/227, 233/239, 245/251, 257/263, 269/275, 281/287, 283/289, 305/311, и 317/323.

Предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) (SEQ ID NO: 1), причем антитело содержит CDR последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и CDR последовательности вариабельной домена легкой цепи (VL), причем последовательность домена VH имеет по меньшей мере 95% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126, 138, 150, 162, 174, 186, 198, 210, 222, 234, 246, 258, 270, 282, 294, 306 и 318, и/или последовательность домена VL, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312 и 324.

В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 114, а VL приведен в SEQ ID NO: 120. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 126, а VL приведен в SEQ ID NO: 132. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 138, а VL приведен в SEQ ID NO: 144. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 150, а VL приведен в SEQ ID NO: 156. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 162, а VL приведен в SEQ ID NO: 168. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 174, а VL приведен в SEQ ID NO: 180. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 186, а VL приведен в SEQ ID NO: 192. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 198, а VL приведен в SEQ ID NO: 204. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 210, а VL приведен в SEQ ID NO: 216. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 222, а VL приведен в SEQ ID NO: 228. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 234, а VL приведен в SEQ ID NO: 240. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 246, а VL приведен в SEQ ID NO: 252. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 258, а VL приведен в SEQ ID NO: 264. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 270, а VL приведен в SEQ ID NO: 276. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 282, а VL приведен в SEQ ID NO: 288. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 294, а VL приведен в SEQ ID NO: 300. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 306, а VL приведен в SEQ ID NO: 312. В варианте осуществления VH приведен в SEQ ID NO: 318, а VL приведен в SEQ ID NO: 324.

В варианте осуществления антитело против CB1 представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

В варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент против CB1 содержит

фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab)₂ или фрагмент scFv.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит человеческую Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE и IgM.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит модифицированную человеческую Fc-область, выбранную из группы, состоящей из L234A/L235A («LALA»), S228P, A330S, P331S, E233P/L234V/L235A, A327G/A330S/P331S, L234F/L235E/P331S, и N297Q.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует или является антагонистом активности сигналинга CB1.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает, активирует или является агонистом сигналинга CB1.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой обратный агонист активности сигналинга CB1.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое антитело.

Предложены антитела против CB1 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются по существу с тем же эпитопом CB1, что и выделенное антитело против CB1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложены антитела против CB1 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за связывание с CB1 с выделенным антителом против CB1 человека или его антигенсвязывающим фрагментом.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с CB1, имеет аффинность связывания K_d для CB1 около 1 пМ или менее.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с CB1, имеет аффинность связывания K_d для CB1 около 100 нМ или менее.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или антигенсвязывающий фрагмент проявляет пониженное проникновение в мозг по сравнению с римонабантом.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует сигналинг CB1 по меньшей мере в 2 раза выше по сравнению с римонабантом.

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или антигенсвязывающий фрагмент проявляет пониженные побочные эффекты со стороны ЦНС по сравнению с

римонабантом.

Предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложен вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложен способ модуляции сигналинга СВ1, причем способ включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей СВ1, с антителом против СВ1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Предложен способ вызова антагонизма СВ1, причем способ включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей СВ1, с антителом против СВ1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Предложен способ вызова агонизма СВ1, причем способ включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей СВ1, с антителом против СВ1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Предложен способ вызова обратного агонизма СВ1, причем способ включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей СВ1, с антителом против СВ1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложен способ ингибирования биологической активности СВ1 у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, тем самым ингибируя активность белка СВ1 у субъекта.

Предложен способ лечения заболевания, связанного с активностью СВ1, причем способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, субъекту, страдающему этим заболеванием.

Предложен способ лечения заболевания или нарушения, отвечающего на модуляцию сигналинга СВ1, у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложен способ лечения заболевания или нарушения, отвечающего на антагонизм или обратный агонизм сигналинга СВ1, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложен способ лечения заболевания или нарушения, отвечающего на агонизм

сигналинга СВ1, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Предложен способ диагностики заболевания или нарушения, связанного с СВ1, причем способ включает приведение в контакт клетки с антителом против СВ1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В одном варианте осуществления заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из ожирения, синдромальных ожирений, включая синдром Прадера-Вилли (СПВ), синдром Альстрема, синдром Барде-Биделя (СББ), наследственную остеодистрофию Олбрайта (НОО) и синдром делеции SIM1, диабет и связанные с ним осложнения; дислипидемию; заболевания печени, такие как, например, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), неалкогольная жировая болезнь печени и первичный билиарный цирроз; фиброз, например, фиброз почек; хроническое заболевание почек; диабетическая невропатия, фокально-сегментарный гломерулосклероз, почечная недостаточность; метаболические заболевания, остеопороз, атеросклероз, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, рак, боль, системный склероз, спастичность при рассеянном склерозе, глаукома и никотиновая зависимость.

В одном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой заболевание почек (например, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), диабетическую нефропатию, синдром Альпорта, гипертоническую болезнь почек, нефротический синдром, стероид-резистентный нефротический синдром, болезнь минимальных изменений, мембранозную нефропатию, идиопатическую мембранозную нефропатию, мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (МПГН), опосредованный иммунным комплексом МПГН, комплемент-опосредованный МПГН, волчаночный нефрит, постинфекционный гломерулонефрит, болезнь тонкой базальной мембраны, мезангиальный пролиферативный гломерулонефрит, амилоидоз (первичный), C1q -нефропатию, быстро прогрессирующий ГН (гломерулонефрит), анти-БМК-нефрит (анти-БМК-антитела к базальной мембране), С3-гломерулонефрит, гипертонический нефросклероз, IgA-нефропатию, протеинурическую форму болезни почек, микроальбуминурию или макроальбуминурию, заболевание почек), легочную артериальную гипертензию, боль (например, нейропатическую или висцеральную боль), рак (например, химиорезистентный рак молочной железы, резистентный к адриамицину рак молочной железы, химиорезистентный колоректальный рак, медуллобластома или ангиогенез опухоли), тревогу, депрессию, связанный с трансплантатом ФСГС, связанный с трансплантатом нефротический синдром, связанную с трансплантатом протеинурию, холестатическую болезнь печени, поликистоз почек, аутосомно-доминантный поликистоз почек (АДПП), ожирение, инсулинорезистентность, диабет II типа, предиабет, метаболический синдром, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), диабетический гастропарез или гастропарез.

Предложен конъюгат антитела, содержащий выделенное антитело против СВ1 или

его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с агентом, выбранным из группы, состоящей из терапевтического агента, цитотоксического агента, молекулы иммуноадгезии и визуализирующего агента.

Предложен набор, содержащий выделенное антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и инструкции по применению антитела в иммунологическом анализе.

Краткое описание графических материалов

Вышеупомянутые и другие признаки и преимущества данного изобретения, а также само изобретение будут более понятны из следующего описания вариантов осуществления при прочтении вместе с прилагаемыми графическими материалами, на которых:

На Фиг. 1 показаны результаты анализа цАМФ. Клетки cAMP Hunter™ CHO-K1 CNR1 Gi обрабатывали антителами к CB1, изотипическим контролем или низкомолекулярным антагонистом CB1 JD5037 с последующей стимуляцией 30 нМ агониста CP-55940 (обозначено как «Плюс CP») в присутствии форсколина. Антагонисты также тестировали без добавления CP-55940, чтобы установить, обладают ли они агонистической активностью. Условные сокращения: CAB=буфер для анализа клеток, указывает на фон в анализе; CAB/F=CAB плюс 15 пМ форсколина, представляет максимальное количество цАМФ в анализе; CAB/F/CP=CAB/F плюс 30 нМ CP-55940, соответствует -EC80 для CP-55940.

На Фиг. 2 показаны результаты анализа p-ERK. Анализы фосфо /общего ERK проводили с использованием клеток cAMP Hunter™ CHO-K1 CNR1 Gi. Клетки обрабатывали мышиными антителами против CB1 или низкомолекулярным антагонистом CB1 JD5037 с последующей стимуляцией 30 нМ агониста CP-55940 в присутствии форсколина. В конце лечения планшеты обрабатывали для определения p-ERK/общего ERK с использованием набора MesoScale Discovery (MSD). Результаты представлены в виде процента от максимального ответа (% макс.).

На Фиг. 3А показано связывание мышиных антител против huCB1 с клетками huCB1-CHO. Кривые связывания очищенных мышиных антител против CB1 титровали в 3 раза, начиная с концентраций антител 200 нМ. Все антитела проявляют специфическое связывание с клетками huCB1 - CHO.

На Фиг. 3В показано связывание мышиных антител против huCB1 с клетками moCB1 - CHO. Все антитела демонстрируют отсутствие связывания с клетками moCB1 - CHO.

На Фиг. 4 показана оценка связывания очищенных антител против CB1 в присутствии и в отсутствие низкомолекулярного агониста и антагониста CB1 CP5990 и JD5037, соответственно.

На Фиг. 5А показана консенсусная последовательность, полученная при выравнивании аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи гибридомных антител M1-M8.

На Фиг. 5В показана консенсусная последовательность, полученная при выравнивании аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи гибридных антител М1-М8.

На Фиг. 6А показана консенсусная последовательность, полученная в результате выравнивания аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи из гуманизированных антител М7-Н1 с М7-Н16, М5-Н1 и М5-Н2.

На Фиг. 6В показана консенсусная последовательность, полученная в результате выравнивания аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи из гуманизированных антител М7-Н1 с М7-Н16, М5-Н1 и М5-Н2.

На Фиг. 7А показано связывание клеток при одной концентрации антитела 30 пг/мл на клетках CHO-huCB-1 и исходных клетках CHO вариантов клонов гуманизированных антител к СВ-1 М5 и М7.

На Фиг. 7А показано связывание клеток при одной концентрации антитела 30 пг/мл на клетках CHO-huCB-1 и исходных клетках CHO вариантов клона гуманизированного антитела к СВ-1 М7.

На Фиг. 8А показаны результаты анализа цАМФ, как описано в Примере 3. На Фиг. 8А показано параллельное сравнение различных остовов для антитела М5.

На Фиг. 8В показаны результаты анализа цАМФ, как описано в Примере 3. На Фиг. 8В показано параллельное сравнение различных остовов для антитела М7.

На Фиг. 9А показаны результаты анализа p-ERK, как описано в Примере 4. На Фиг. 9А показано параллельное сравнение различных остовов для антитела М5.

На Фиг. 9В показаны результаты анализа p-ERK, как описано в Примере 4. На Фиг. 9В показано параллельное сравнение различных остовов для антитела М7.

На Фиг. 10 показаны результаты анализа цАМФ на обратный агонизм с использованием способов, аналогичных описанным в Примере 3. Клетки cAMP Hunter™ CHO-K1 CNR1 Gi обрабатывали антителами к СВ1 или изотипическим контролем с последующим добавлением форсколина. Пунктирная фиолетовая линия представляет уровень цАМФ, высвобождаемый при обработке форсколином, максимальное количество цАМФ в анализе. Красная линия соответствует низкомолекулярному агонисту СВ1 CP-55940, используемому в качестве контроля для анализа. Соединения, обладающие активностью обратного агониста, имеют кривые, идущие в направлении, противоположном агонисту, над линией САВ/Ф. Этот эксперимент демонстрирует, что оба протестированных варианта М7 обладают активностью обратного агониста.

Подробное описание сущности изобретения

Если не указано иное, используемые в данном документе научные и технические термины имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. В случае любой скрытой двусмысленности определения, приведенные в данном документе, имеют приоритет над любым словарным или внешним определением. Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать

единственное число. Слово в единственном числе означает «по меньшей мере один», если не указано иное. Значение фразы «по меньшей мере один» эквивалентно значению фразы «один или более». Слово «или» означает «и/или», если не указано иное. Используемые в данном документе термины «содержит», «содержащий», «включающий», «имеющий» и т.п. могут иметь значение, приписываемое им в патентном законодательстве США, и могут означать «включает», «включая» и тому подобное; «состоящий по существу из» или «состоит по существу» также имеет значение, определенное в патентном законодательстве США, и этот термин является неограниченным, допускающим наличие большего, чем то, что перечислено, при условии, что основные или новые характеристики не изменены, но исключает варианты предшествующего уровня техники. Если специально не оговорено или не очевидно из контекста, при использовании в данном документе термин «около» понимается как «в пределах диапазона нормального допуска» в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. Около может находиться в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от заявленного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, представленные в данном документе, модифицированы термином «около».

Способы и методики, представленные в данном документе, обычно выполняются в соответствии с обычными методами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании, если не указано иное. Номенклатуры, лабораторные процедуры и методы культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, а также химии и гибридизации белков и нуклеиновых кислот, аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, являются хорошо известными и обычно используются в данной области техники. Стандартные методы используются для ферментативных реакций и методов очистки, химического синтеза, химических анализов, фармацевтического приготовления, составления, доставки, а также лечения пациентов.

Считается, что диапазоны, приведенные в данном документе, являются сокращением для всех значений в пределах диапазона. Например, под диапазоном «от 1 до 50» понимается любое число, комбинация чисел или поддиапазон из группы, состоящей из чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

Термин «каннабиноидный рецептор 1-го типа» или «CB1» означает 7-трансмембранный рецептор клеточной мембраны, кодируемый геном CNR1 и имеющий каноническую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (см. <https://www.uniprot.org/uniprot/P21554>). В Таблице 1 приведена эта последовательность, а также все 5 доменов белка.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности каннабиноидного рецептора 1-го

типа

Домен	Аминокислотный остаток	SEQ ID NO:
Полная	12345678901234567890123456789012345678901234567890	1
	MKSILDGLADTTTFRITITDILLYVGSNDIQYEDIKG DMASK LGYFPQKFP LT S FRGS P FQEKMTAGDN PO LVPADQVNIT E FYNKSLSSFKENEENIQCGENFMDIECFMVLNPSQ QLAIA VL S LT LGT FT VLENLL VLCVILH S RS L RC RP S YH FIGS IA VADLLGSVIFVYSFIDFHV FHRKDSRNVFLFKLGG VTASF TASVGSFLTAIDRYISIHRLAYKRIVTRPKAWA FCLM WTI.AIVIAVLPLLGNCEKLQSVCSDFPHIDETY LMFWI GVT SVLLL FIVYAYMYILWKAH S HAVRMIQRGTQKSIIIH T S EDGKVQVTRP DQARMDIRLAKT LVLILVVLIIICWGPLL AIMVYDVFGKMNKLIKTVFAFCMLCLLNSTVNP IIYALR SKDLRHAFRSMFPSCEGTAQPLDNSMGDSCLH KHANNAA S VHRAAE SCIKSTVKXAKVTMSVST DTSAEAL	
1 (внеклеточный)	Аминокислоты 1-116 из SEQ ID NO: 1	2
2 (трансмембранный)	Аминокислоты 117-142 из SEQ ID NO: 1	3
3 (цитоплазматический)	Аминокислоты 143-154 из SEQ ID NO: 1	4
4 (трансмембранный)	Аминокислоты 155-175 из SEQ ID NO: 1	5
5 (внеклеточный)	Аминокислоты 176-187 из SEQ ID NO: 1	6
6 (трансмембранный)	Аминокислоты 188-212 из SEQ ID NO: 1	7
7 (цитоплазматический)	Аминокислоты 213-232 из SEQ ID NO: 1	8
8 (трансмембранный)	Аминокислоты 233-255 из SEQ ID NO: 1	9
9 (внеклеточный)	Аминокислоты 256-273 из SEQ ID NO: 1	10
10 (трансмембранный)	Аминокислоты 274-299 из SEQ ID NO: 1	11
11 (цитоплазматический)	Аминокислоты 300-344 из SEQ ID NO: 1	12

12 (трансмембранный)	Аминокислоты 345-365 из SEQ ID NO: 1	13
13 (внеклеточный)	Аминокислоты 366-377 из SEQ ID NO: 1	14
14 (трансмембранный)	Аминокислоты 378-399 из SEQ ID NO: 1	15
15 (цитоплазматический)	Аминокислоты 400-472 из SEQ ID NO: 1	16

Термин «центральный CB1» означает CB1, локализованный в любом месте тела, включая мозг и ЦНС.

Термин «периферический CB1» означает CB1, который не локализован в головном мозге или ЦНС (например, периферически-ограниченный CB1).

Термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается с конкретным антигеном или взаимодействует с ним. Термин включает, но не ограничивается ими, поликлональные, моноклональные, моносpezifические, полиspezические, неspezические, гуманизированные, одноцепочечные, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутированные и привитые антитела. Если иное не изменено термином «интактные», как в «интактных антителах», для целей этого описания, термин «антитело» также включает фрагменты антител, такие как Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb и другие фрагменты антител, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию, т.е. способность специфически связывать CB1. Как правило, такие фрагменты содержат антигенсвязывающий домен. Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры. В варианте осуществления полноразмерного антитела каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). CH состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). CL состоит из одного домена CL. VH и VL могут быть дополнительно поделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Как правило, каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1; CDR1; FR2; CDR2; FR3; CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления FR антитела против CB1 могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR и/или FR. Молекулы антител могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Термины «набор HCDR» и «набор LCDR» относятся к группе из трех CDR, которые встречаются в одной вариабельной области или тяжелой или легкой цепи, соответственно, которые способны связывать антиген. Термин «пара (набор HCDR/набор LCDR)» относится к спариванию набора HCDR и LCDR, обеспечивающего шесть CDR, которые составляют сайт связывания антигена. Точные границы этих CDR были определены по-разному согласно разным системам. Система, описанная Кабатом (Kabat et al. (1987) и (1991)), не только обеспечивает однозначную систему нумерации остатков, применимую к любой вариабельной области антитела, но также обеспечивает точные границы остатков, определяющие три CDR. Эти CDR могут называться CDR по Кабату. Термин «нумерация по Кабату» означает систему нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем другие аминокислотные остатки в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-391 и Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Для вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область находится в диапазоне положений аминокислот 31-35 для CDR1, положений аминокислот 50-65 для CDR2 и положений аминокислот 95-102 для CDR3. Для вариабельной области легкой цепи гипервариабельная область находится в диапазоне положений аминокислот 24-34 для CDR1, положений аминокислот 50-56 для CDR2 и положений аминокислот 89-97 для CDR3. Чотиа и соавторы (Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877-883) обнаружили, что определенные подчасти в CDR по Кабату принимают почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Эти подчасти были обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где «L» и «H» обозначают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области могут называться CDR по Чотиа, границы которых перекрываются с CDR по Кабату. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR по Кабату, были описаны Padlan (1995) *FASEB J.* 9: 133-139 и Maccallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262(5):732-45). Тем не менее, другие определения границ CDR могут не строго соответствовать одной из описанных в данном документе систем, но, тем не менее, будут перекрываться с CDR по Кабату, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете прогнозов или экспериментальных данных о том, что отдельные остатки или группы остатков или даже целые CDR существенно не влияют на связывание антигена. Композиции и способы, описанные в данном документе, могут использовать CDR, определенные в соответствии с любой из этих систем.

Термин «пара VH/VL» относится к VH и VL, которые являются спаренными и способны связывать антиген.

Термин «пара HC/LC» относится к HC и LC, которые являются спаренными и способны связывать антиген.

Термин «Fc-область» означает C-концевую область тяжелой цепи

иммуноглобулина, которая может быть получена путем расщепления папаином интактного антитела. Fc-область может представлять собой Fc-область с нативной последовательностью или вариант Fc-области. Fc-область иммуноглобулина, как правило, содержит два константных домена, домен СН2 и домен СН3, и необязательно содержит домен СН4. Замены аминокислотных остатков в Fc-части для изменения эффекторной функции антитела известны в данной области техники (например, патенты США №№ 5648260 и 5624821). Fc-область опосредует несколько важных эффекторных функций, например, индукцию цитокинов, антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), фагоцитоз, комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) и период полужизни/скорость выведения антител и комплексов антиген-антитело. В некоторых случаях эти эффекторные функции желательны для терапевтического иммуноглобулина, но в других случаях могут быть ненужными или даже вредными, в зависимости от терапевтических целей.

Термины «антитело, связывающее СВ1» и «антитело против СВ1» означают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают растворимый белок СВ1 или его фрагмент (например, часть внеклеточного домена СВ1) и/или СВ1 экспрессируется на клеточной поверхности. Выражение «СВ1, экспрессируемое на клеточной поверхности» означает белок СВ1 или его часть, которые экспрессируются на клеточной поверхности *in vitro* или *in vivo*, так что по меньшей мере часть белка СВ1 экспонируется на внеклеточной стороне клеточной мембраны и становится доступной для антигенсвязывающей части антитела.

Термины «связывающий СВ1 белок» или «связывающий белок против СВ1» означают белки, которые связываются с СВ1, которые содержат весь или часть антигенсвязывающего фрагмента и включают белки, которые имеют альтернативное расположение типичных доменов или каркаса антител, такие как рекомбинантные поливалентные или мультиспецифические иммуноглобулины, а также конъюгаты и слитые белки. Связывающие СВ1 белки согласно данному изобретению и их варианты и мутанты сохраняют связывание СВ1 и функцию или могут обеспечивать дополнительные или альтернативные функции. Такие связывающие СВ1 белки входят в объем данного изобретения и хорошо известны специалистам в данной области техники.

Термины «антигенсвязывающий домен» и «антигенсвязывающий фрагмент» по отношению к связывающему белку, такому как антитело, означают часть или фрагмент антитела, его варианта или мутанта, которые сохраняют способность специфически связываться с целевым антигеном антитела и включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной ДНК и генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей

вариабельные и необязательно константные домены антитела. Один или более вариабельных и/или константных доменов могут быть расположены в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д. В данной области техники известны многочисленные форматы фрагментов, мутантных или вариантных антител, содержащие антигенсвязывающие фрагменты. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, содержащий домены VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, содержащий домены VL и VH одного плеча антитела; (v) одноцепочечную молекулу Fv (scFv); (vi) фрагмент dAb, содержащий один вариабельный домен; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как специфические к домену антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, линейные антитела (содержащие пару tandemных сегментов Fv; VH-CH1-VH-CH1, которые образуют пару антигенсвязывающих сайтов с комплементарными полипептидами легкой цепи), триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например, моновалентные наноантитела, двухвалентные наноантитела и т. д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы также входят в выражение «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте данного описания. Термин «его антигенсвязывающий фрагмент» не предназначен для ограничения и включает фрагменты, содержащиеся в вариантных молекулах, которые могут иметь дополнительные или перегруппированные области антитела, например, мультиспецифические антитела и конъюгаты антител, которые сохраняют одно и то же связывание антигена с конкретным антигеном.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом с одной или более каркасными последовательностями или находится в рамке с ними, в антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен VH, связанный с доменом VL, домены VH и VL могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен VH или VL.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные

конфигурации переменных и постоянных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно данному изобретению, включают: (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; и (xiv) VL-CL. В любой конфигурации переменных и постоянных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и постоянные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или постоянными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и постоянного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерных доменов VH или VL (например, дисульфидной связи(-ями)).

Как и в случае с молекулами полных антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифических антител, описанные в данном документе, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно данному изобретению с использованием стандартных способов, доступных в данной области техники.

Термин «специфичность» или «специфичность для» применительно к связывающему белку означает способность связывающего белка селективно связывать мишень или антиген, например, с большей аффинностью (то есть с более низким значением K_d), чем для любой другой мишени или антигена.

Антитела согласно данному изобретению могут в некоторых вариантах осуществления действовать посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). КЗЦ соответствует лизису антигенэкспрессирующих клеток с помощью антитела согласно изобретению в присутствии комплемента. АЗКЦ относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, натуральные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на целевой клетке, что приводит к лизису целевой клетки. КЗЦ и АЗКЦ могут быть измерены с применением анализов, которые

известны и доступны в данной области техники. (См., например, патенты США №№ 5500362 и 5821337 и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95: 652-656).

Термин «мышинное антитело» означает антитело, которое имеет переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии мыши. Мышинные антитела могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии мыши (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «мышинное антитело» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как человек, были привиты к мышинным каркасным последовательностям.

Термин «рекомбинантное антитело» означает антитело, которое получено, экспрессировано, создано или выделено рекомбинантными способами, например, антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной библиотеки комбинаторных антител, антитела, выделенные из животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. В некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования животного, трансгенного в отношении последовательностей иммуноглобулина, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии и родственны им, в природе могут не существовать в рамках конкретного репертуара антител зародышевой линии *in vivo*.

Термин «выделенное антитело» означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или выделено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело существует или естественным образом вырабатывается, является «выделенным антителом» для целей данного изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, прошедшие по меньшей мере одну стадию очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин «нейтрализующее» или «блокирующее» антитело означает антитело, связывание которого с его лигандом или антигеном противодействует биологической

активности лиганда или антигена. В варианте осуществления нейтрализующий связывающий белок связывается с антигеном (например, цитокином) и снижает его биологическую активность на по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Нейтрализующее антитело, которое связывается с СВ1: (i) препятствует взаимодействию между СВ1 или фрагментом СВ1 и лигандом СВ1 (например, каннабиноидом и т. д.), и/или (ii) приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической функции СВ1. Ингибирование, вызванное нейтрализующим или блокирующим СВ1 антителом, не обязательно должно быть полным, если его можно обнаружить с помощью соответствующего анализа. В данном документе описаны иллюстративные анализы для обнаружения ингибирования СВ1.

Термин «аффинность» означает силу взаимодействия между связывающим белком и его целевым антигеном и определяется последовательностью CDR связывающего белка, а также природой антигена и антитела, например, их размером, формой и/или зарядом. Связывающие белки могут быть выбраны по аффинности, которая обеспечивает желаемые терапевтические конечные точки при минимизации негативных побочных эффектов. Аффинность можно измерить с использованием способов, известных специалистам в данной области техники.

Термин «антитело с созревшей аффинностью» означает, что в одну или более их CDR или FR были внесены одно или более изменений, которые приводят к повышению аффинности антитела к его целевому антигену по сравнению с неизмененным «исходным» антителом, которое не обладает этим(-и) изменением(-ями). Иллюстративные антитела с созревшей аффинностью будут иметь наномолярную или даже пикомолярную аффинность к целевому антигену. Антитела с созревшей аффинностью получают способами, известными в данной области техники. Например, Marks et al. (1992) *BioTechnology* 10: 779- 783 описывает созревание аффинности путем перестановки доменов VH и VL. Случайный мутагенез CDR и/или каркасных остатков описан в Barbas et al. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) *Gene* 169: 147-155; Yelton et al. (1995) *J. Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) *J. Immunol.* 154(7): 3310-9; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896, и мутации в положениях селективного мутагенеза, положениях контакта или сверхмутации с аминокислотным остатком, повышающим активность, описаны в патенте США № 6914128.

Термин «антитело с привитой CDR» означает антитело, которое содержит последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, в которых последовательности одной или более областей CDR VH и/или VL заменены последовательностями CDR другого антитела. Например, два антитела могут принадлежать к разным видам, таким как антитела, имеющие вариабельные области тяжелой и легкой цепей мыши, в которых одна или более последовательностей CDR мыши заменены последовательностями CDR человека.

Термин «гуманизированное антитело» означает антитело из нечеловеческого вида,

которое было изменено, чтобы быть более похожим на последовательности зародышевой линии человека. Один тип гуманизированного антитела представляет собой антитело с привитой CDR, в котором одна или более последовательностей CDR не принадлежат человеку, а последовательности каркасной области (FR) являются человеческими или практически человеческими (например, они на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичны) аминокислотной последовательности человеческого антитела. Гуманизированное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), в которых последовательность всех или практически всех областей CDR соответствует таковой из иммуноглобулина отличного от человека животного и последовательность всех или практически всех областей FR является таковой из человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также может содержать область CH1, шарнирную область, области CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. В одном варианте осуществления гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть Fc-области человеческого иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированный переменный домен легкой цепи и/или гуманизированный переменный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит легкую цепь, а также по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит тяжелую цепь, а также по меньшей мере переменный домен легкой цепи.

Термин «эффективность» означает способность связывающего белка достигать желаемого эффекта и является мерой его терапевтической эффективности. Эффективность можно оценить с помощью способов, известных специалисту в данной области техники.

Термин «эффективное количество» означает дозировку или количество, достаточное для снижения активности CB1, чтобы привести к облегчению симптомов у пациента или для достижения желаемого биологического результата. Желаемые биологические результаты включают, например, снижение или повышение активности CB1.

Термин «перекрестно-реактивный» означает способность связывающего белка связывать целевой антиген, отличный от того, против которого было выработано антитело. Как правило, связывающий белок будет связывать свой целевой антиген с соответствующей высокой аффинностью, но может связываться с тем же целевым антигеном другого вида или проявлять низкую аффинность к антигенам, не являющимся мишенями. Отдельные связывающие белки, как правило, выбирают по двум критериям: (1) окрашивание ткани, соответствующее известной экспрессии целевого антитела; и (2)

аналогичный паттерн окрашивания между тканями человека и видов, на которых исследуется токсичность, (например, мыши и яванского макака) из одного и того же органа. Специалистам в данной области техники известны эти и другие способы оценки перекрестной реактивности.

Термин «биологическая функция» означает специфическую активность связывающего белка *in vitro* или *in vivo*, независимо от того, присутствует ли он в природе или активируется рекомбинантными способами. Связывающие белки могут нацеливаться на несколько классов антигенов и достигать желаемых терапевтических результатов за счет множества механизмов действия. Связывающие белки могут агонизировать, антагонизировать или нейтрализовать активность своих мишеней. Связывающие белки могут способствовать удалению мишеней, с которыми они связываются, или могут вызывать цитотоксичность при связывании с клетками. Части двух или более антител могут быть включены в поливалентный формат для достижения различных функций в одной молекуле связывающего белка. Биологические активности включают, но не ограничиваются ими, связывание с рецептором, индукцию пролиферации клеток, ингибирование роста клеток, индукцию других цитокинов, индукцию апоптоза и ферментативную активность. Анализы *in vitro* и модели *in vivo*, используемые для оценки биологической функции, известны специалисту в данной области техники.

Термин «стабильный» означает способность сохранять свою физическую, химическую и/или биологическую целостность или активность в течение определенного периода времени или условий хранения. Как правило, желателен связывающий белок, который является стабильным *in vitro* при различных температурах в течение длительного периода времени. Способы стабилизации связывающих белков и оценки их стабильности при различных температурах известны специалистам в данной области техники.

Термин «растворимость» означает способность белка оставаться диспергированным в водном растворе. Растворимость белка в водном составе зависит от правильного распределения гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, и, следовательно, растворимость может коррелировать с образованием правильно свернутых белков. Специалист в данной области техники сможет обнаружить увеличение или уменьшение растворимости связывающего белка с использованием обычных методик и методов ВЭЖХ, известных специалисту в данной области техники.

Термин «иммуногенность» означает способность вещества вызывать иммунный ответ. Введение терапевтического связывающего белка может привести к определенной частоте иммунного ответа. Способы снижения иммуногенности антител и связывающих белков известны специалистам в данной области техники.

Термин «обнаруживаемая метка» означает фрагмент, присоединенный к члену пары специфического связывания, такому как антитело или его аналит, чтобы сделать возможной реакцию (например, связывание) между членами пары специфического связывания обнаруживаемой. Меченый член пары специфического связывания относится к «обнаруживаемо меченому». Таким образом, термин «меченый связывающий белок»

относится к белку с введенной обнаруживаемой меткой, которая обеспечивает идентификацию связывающего белка. В одном варианте осуществления обнаруживаемая метка может давать сигнал, который обнаруживается с помощью визуальных или инструментальных средств, например, путем включения радиоактивно меченной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или имеющего ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами). Примеры обнаруживаемых меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , или ^{153}Sm); хромогены; флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры); ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, люциферазу, щелочную фосфатазу); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, метки эпитопов); и магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния. Репрезентативные примеры меток, обычно используемых для иммуноанализов, включают фрагменты, которые продуцируют свет, например, соединения акридиния, и фрагменты, которые продуцируют флуоресценцию, например, флуоресцеин. В связи с этим сам фрагмент может быть необнаруживаемо помечен, но может стать обнаруживаемым при реакции с еще одним фрагментом.

Термин «конъюгат» относится к связывающему белку, такому как антитело, который химически связан с другой функциональной молекулой или вторым химическим фрагментом, таким как терапевтический агент, цитотоксический агент, цитостатический агент или визуализирующий агент (см., например, 7850962). Термин «агент» включает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу, такую как пептид белка, или экстракт, полученный из биологических материалов. В одном варианте осуществления терапевтические или цитотоксические агенты включают, но не ограничиваются ими, антиметаболит, алкилирующий агент, антибиотик, фактор роста, цитокин, антиангиогенный агент, антимитотический агент, антрациклин, токсин и апоптотический агент. Пригодные агенты включают, например, коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, дауномицин, дигидрокси антрацин дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, и их аналоги или гомологи. Визуализирующие агенты, полезные для изготовления конъюгатов связывающих белков против СВ1, включают, но не ограничиваются ими, радиоактивную метку, фермент, флуоресцентную метку, люминесцентную метку, биолуминесцентную метку, магнитную метку и биотин. При использовании в контексте иммуноанализа

конъюгатное антитело может представлять собой обнаруживаемое меченое антитело, используемое в качестве детектирующего антитела. Антитела могут быть связаны путем химического сшивания или при помощи рекомбинантных способов. Антитела также могут быть связаны с одним из множества небелковых полимеров, например, с полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, как указано в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192; или 4179337. Антитела можно химически модифицировать путем ковалентной конъюгации с полимером, например, для увеличения их периода полужизни в кровотоке. Иллюстративные полимеры и способы их присоединения также показаны в патентах США №№ 4766106; 4179337; 4495285 и 4609546.

Термин «кристаллизованный» означает связывающий белок, который существует в форме кристалла. Кристаллы представляют собой одну из форм твердого состояния вещества, которая отличается от других форм, таких как аморфное твердое состояние или жидкокристаллическое состояние. Кристаллы состоят из регулярных повторяющихся трехмерных массивов атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных агрегатов (например, комплексов антиген/антитело).

Термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к петле двухцепочечной кольцевой ДНК, в которую могут быть лигированы другие сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Другие векторы включают РНК-векторы. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эпизомные векторы млекопитающего). Другие векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина (например, неэпизомальные векторы млекопитающих). «Рекомбинантные векторы экспрессии» или «векторы экспрессии» способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В данном описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако также включены другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Термины «рекомбинантная клетка-хозяин» или «клетка-хозяин» означают клетку, в которую была введена экзогенная ДНК или РНК. Такие термины относятся не только к конкретной клетке субъекта, но и к потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или влияний окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным исходной клетке, но все же включено в объем термина «клетка-хозяин», который используется в

данном документе. В варианте осуществления клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки. В варианте осуществления эукариотические клетки включают клетки простейших, грибов, растений и животных. В другом варианте осуществления клетки-хозяева включают, но не ограничиваются ими, линию прокариотических клеток *E. coli*; линии клеток млекопитающих CHO, HEK 293, COS, NSO, SP2 и PER.C6; линию клеток насекомых Sf9; и клетки грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Термин «трансфекция» означает множество методик, как правило, используемых для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, например, электропорацию, преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию DEAE-декстраном и тому подобное.

Термин «биологический образец» означает количество вещества из живого или ранее живого существа. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, кровь, плазму, сыворотку, мочу, амниотическую жидкость, синовиальную жидкость, эндотелиальные клетки, лейкоциты, моноциты, другие клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфатические узлы и селезенку.

Термин «контроль» относится к композиции, о которой известно, что она либо не содержит аналита («отрицательный контроль»), либо содержит аналит («положительный контроль»). Положительный контроль может иметь известную концентрацию аналита или может использоваться для определения характеристик анализа и является полезным индикатором целостности реактивов.

Термин «пара специфического связывания» означает две разные молекулы, которые специфически связываются друг с другом химическими или физическими способами. Пары специфического связывания включают, например, антитело и его антиген, биотин и авидин (или стрептавидин), углевод и лектин, комплементарные нуклеотидные последовательности, эффекторные и рецепторные молекулы, кофакторы и ферменты, ферменты и ингибиторы, и ферменты, и фрагменты и их аналоги, которые сохраняют специфическое связывание. Примером пары специфического связывания являются области VH и VL антитела («VH/VL»).

Термин «линкер» означает аминокислотный остаток или полипептид, содержащий два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, которые используются для связывания двух полипептидов (например, двух доменов VH или двух доменов VL). Линкеры хорошо известны в данной области техники (см., например, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или

линейными. Конформационный эпитоп образуется пространственно соединенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных случаях эпитоп может содержать фрагменты аминокислот, сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене и может иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические зарядовые характеристики. Связывающие белки «связываются с одним и тем же эпитопом», если они связываются с одними и теми же аминокислотами на антигене, а также могут перекрестно конкурировать (одно антитело предотвращает связывание или модулирующий эффект другого). Кроме того, структурные определения эпитопов (перекрывающиеся, похожие, идентичные) являются информативными; а функциональные определения охватывают структурные (связывание) и функциональные (модуляция, конкуренция) параметры.

Термин «фармакокинетический» означает процесс, посредством которого лекарственное средство абсорбируется, распределяется, метаболизируется и выводится из организма.

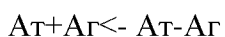
Термин «биодоступность» означает количество активного лекарственного средства, которое достигает своей цели после введения. Биодоступность является функцией нескольких свойств, включая стабильность, растворимость, иммуногенность и фармакокинетику, и может быть оценена с использованием способов, известных специалисту в данной области техники.

Термин «поверхностный плазмонный резонанс» обозначает оптическое явление, которое позволяет анализировать биоспецифические взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице, например, с использованием системы BIAcore® (BIAcore International AB, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, штат Нью-Джерси; Jonsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26).

Термины «Kon», «константа скорости ассоциации» и «Ka» означают константу скорости ассоциации связывающего белка (например, антитела) с антигеном с образованием комплекса связывающий белок/антиген. Это значение указывает на скорость связывания связывающего белка с его целевым антигеном или скорость образования комплекса между связывающим белком и антигеном, как показано в следующем уравнении:



Термины «Koff» и «константа скорости диссоциации» означают константу скорости диссоциации связывающего белка (например, антитела) от комплекса связывающий белок/антиген. Это значение указывает на скорость диссоциации связывающего белка от его целевого антигена или разделение комплекса Ат-Аг в течение времени на свободное антитело и антиген, как показано в следующем уравнении:



Термины «Kd» и «константа равновесной диссоциации» означают значение,

полученное при измерении титрования в состоянии равновесия или путем деления константы скорости диссоциации (K_{off}) на константу скорости ассоциации (K_{on}). Способы определения констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо известны в данной области техники. Способы, основанные на флуоресценции, обеспечивают высокую чувствительность и возможность исследовать образцы в физиологических буферах в состоянии равновесия. Можно использовать другие экспериментальные подходы и инструменты, такие как анализ BIAcore® (BIAcore International AB, Уппсала, Швеция) или анализ KinExA® (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо).

Термин «вариант» означает полипептид, который отличается от данного полипептида по аминокислотной последовательности добавлением, вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, но который сохраняет биологическую активность данного полипептида (например, вариант антитела может конкурировать с нативным антителом за связывание с его мишенью). Консервативная замена аминокислоты заменяет аминокислоту другой аминокислотой со сходными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей) и считается в данной области техники, как правило, включающей незначительные изменения. Эти незначительные изменения можно частично определить на основании индекса гидропатичности аминокислот, как известно в данной области техники. Индекс гидропатичности аминокислоты основан на оценке ее гидрофобности и заряда. Аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности в белке можно взаимно заменять с сохранением функции белка. В одном аспекте проводят замену аминокислот, имеющих индекс гидропатичности ± 2 . Гидрофильность аминокислот также можно использовать для определения замен, которые бы привели к получению белков, сохраняющих биологическую функцию. Учет гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, что является полезным показателем, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Замена аминокислот, имеющих аналогичные значения гидрофильности, может привести к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например, иммуногенность, как известно в данной области техники. В одном аспекте замены выполняются аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах ± 2 друг от друга. Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет конкретный тип боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением понятно, что аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, проявляемого в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах. Термин «вариант» также включает полипептиды или их фрагменты, которые подверглись дифференциальному процессингу, например, путем протеолиза, фосфорилирования или другой посттрансляционной модификации, но при этом сохраняют биологическую активность или реактивность антигена. Термин «вариант» охватывает фрагменты

варианта, если не указано иное. Вариант может быть на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, или 75% идентичны последовательности дикого типа.

Описанные в данном документе антитела против СВ1 могут содержать одну или более аминокислотных замен, добавлений, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых антитела были получены. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными из общедоступных баз данных последовательностей антител. Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, где одну или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR подвергают мутации в соответствующий остаток(-и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(-и) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе называются в совокупности как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки каркасной области и/или CDR в доменах VH и/или VL подвергают мутации обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергают мутации обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы до соответствующего остатка(-ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было изначально получено антитело). Кроме того, антитела согласно данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной области и/или областей CDR, например, при этом определенные отдельные остатки подвергают мутации в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации в

соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желаемых свойств, такие как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от случая), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются данным изобретением.

Термины «существенная идентичность» и «практически идентичны», когда относятся к нуклеиновой кислоте, указывают на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности, соответственно, в по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% нуклеотидных оснований, как измерено любым хорошо известным алгоритмом идентичности последовательностей, таким как FASTA, BLAST или Gap, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или практически аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Термины «существенное сходство» и «в значительной степени подобный» при обращении к полипептиду означают, что две полипептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за делецию по умолчанию, имеют по меньшей мере около 95% идентичности последовательностей, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательностей. В варианте осуществления неидентичные положения остатков отличаются консервативными аминокислотными заменами. Данное изобретение также включает антитела против CB1, содержащие варианты любой из описанных в данном документе аминокислотных последовательностей VH, VL и/или CDR, имеющие одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает антитела против CB1, имеющие аминокислотные последовательности VH, VL и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативными аминокислотными заменами относительно к любой из аминокислотных последовательностей VH, VL и/или CDR, описанных в данном документе. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не

изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень сходства может быть увеличена для корректировки консервативного характера замены. Средства для выполнения этой коррекции хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенный в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанное в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенный в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативное» замещение представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, как правило, измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя меры сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнить с помощью FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по

умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Биологические характеристики антител

Данное изобретение включает антитела против СВ1 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают СВ1 с высокой аффинностью.

Предложены антитела против СВ1 и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые имеют константу скорости ассоциации (K_{on}) по отношению к СВ1, выбранную из группы, состоящей из: по меньшей мере, около $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; по меньшей мере примерно $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; по меньшей мере около $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; по меньшей мере около $10^5 \text{M}^{-1} \text{сек}^{-1}$ и по меньшей мере около $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, как измерено при помощи поверхностного плазмонного резонанса.

Предложены антитела против СВ1 и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые имеют константу скорости диссоциации (K_{off}) от указанной мишени, выбранную из группы, состоящей из: не более чем около 10^{-3}s^{-1} ; не более чем около 10^{-4}s^{-1} ; не более чем около 10^{-5}s^{-1} ; и не более чем около 10^{-6}s^{-1} , как измерено при помощи поверхностного плазмонного резонанса.

Предложены антитела против СВ1 и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые имеют константу диссоциации (KD) для указанной мишени, выбранную из группы, состоящей из: не более чем около 10^{-7}M ; не более чем около 10^{-8}M ; не более чем около 10^{-9}M ; не более чем около 10^{-10}M ; не более чем около 10^{-11}M ; не более чем около 10^{-13}M ; и не более чем около 10^{-14}M . Антитела против СВ1 и их фрагменты могут иметь значение Kd аффинности связывания для СВ1 в диапазоне от около 0,01 нМ до около 500 нМ, от около 0,02 нМ до около 250 нМ, от около 0,02 до около 200 нМ, от около 0,05 до около 100 нМ, от около 0,05 до около 50 нМ. Антитела и их фрагменты могут иметь значение Kd аффинности связывания для СВ1 около 500 нМ или меньше, около 250 нМ или меньше, около 200 нМ или меньше, около 150 нМ или меньше, около 100 нМ или меньше, около 75 нМ или меньше, около 50 нМ или меньше, около 25 нМ или меньше, около 10 нМ или меньше, около 5 нМ или меньше, около 1 нМ или меньше, около 500 пМ или меньше, около 250 пМ или меньше, около 100 пМ или меньше, около 50 пМ или меньше, или около 10 пМ или меньше. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно данному изобретению связывают СВ1 с Kd менее чем около 15 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 8 пМ, менее чем около 6 пМ, менее чем около 4 пМ, менее чем около 2 пМ или менее чем около 1 пМ.

В некоторых вариантах осуществления антитела против СВ1 или их антигенсвязывающие фрагменты являются по меньшей мере такими же мощными, как и низкомолекулярные модуляторы рецепторов СВ1, такие как, например, римонабант, таранабант, АМ251, АМ1387, АМ4113, каннабигерол, ибипинабант, отенабант, суринабант, тетрагидроканнабиварин и виродамин и АМ6545. В некоторых вариантах

осуществления антитела против CB1 или их антигенсвязывающие фрагменты обладают активностью антагониста CB1 или обратного агониста, которая в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз, по меньшей мере 9 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз или по меньшей мере 20 раз больше, чем низкомолекулярные модуляторы рецептора CB1, такие как, например, римонабант, таранабант, AM251, AM1387, AM4113, каннабигерол, ибипинабант, отенабант, суринабант, тетрагидроканнабиварин и виродамин и AM6545. В некоторых вариантах осуществления антитела против CB1 или их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют опосредованную агонистами CB1 передачу сигнала. В некоторых вариантах осуществления ингибирование опосредованной агонистом CB1 передачи сигнала измеряют путем определения внутриклеточных уровней цАМФ и/или фосфорилирования нижележащих ERK.

В некоторых вариантах осуществления антитела против CB1 и их антигенсвязывающие фрагменты имеют преимущество в снижении или отсутствии проникновения через ГЭБ или воздействия на мозг. В некоторых вариантах осуществления проникновение через ГЭБ антител против CB1 и их антигенсвязывающих фрагментов демонстрирует сниженное проникновение в мозг по сравнению с низкомолекулярными агонистами, антагонистами или обратными агонистами CB1 (например, римонабантом, таранабантом, AM251, AM1387, AM4113, каннабигеролом, ибипинабантом, отенабантом, суринабантом, тетрагидроканнабиварином и виродамином и AM6545). В некоторых вариантах осуществления антитела против CB1 и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в данном документе, обеспечивают терапевтический эффект со сниженными побочными эффектами со стороны ЦНС по сравнению с низкомолекулярным агонистом, антагонистом или обратным агонистом рецептора CB1. Побочные эффекты со стороны ЦНС, связанные с римонабантом, низкомолекулярным антагонистом рецепторов CB1, включают, например, тревогу, депрессию, возбуждение, расстройства пищевого поведения, раздражительность, агрессию и бессонницу (Moreira (2009) *Rev. Bras. Psiquiatr.* 31(2): 145-153).

Картирование эпитопов и смежные технологии

Данное изобретение включает антитела против CB1, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными во внеклеточных доменах человеческого CB1 (например, в пределах аминокислот 1-116 и/или внеклеточных петель e1 (аминокислоты 176-187; SEQ ID NO: 6), e2 (аминокислоты 256-273; SEQ ID NO: 10), и/или e3 (аминокислоты 366-377; SEQ ID NO: 14)). Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных во внеклеточном домене CB1. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных во внеклеточном домене CB1. Кроме того, эпитоп, с которым связывается

антитело к СВ, может содержать часть СВ1, которая не является внеклеточной из-за изменения конформации или воздействия из-за связывания. Последовательность СВ1 и его различных доменов представлена в Таблице 1.

Для определения того, «взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами» в полипептиде или белке, можно использовать различные способы, известные специалистам в данной области техники. Примеры методик включают, например, стандартный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., N. Y.), анализ методом аланин-сканирующего мутагенеза, анализ пептидных блотов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-463), и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно использовать такие способы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Другой способ, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, представляет собой водород-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водород-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы позволить водород-дейтериевому обмену происходить на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochem.* 267(2): 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Данное изобретение также включает антитела против СВ1, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, М1, М2, М3, М4, М5 (и их гуманизованных вариантов), М6, М7 (и их гуманизованных вариантов) и М8). Аналогичным образом, данное изобретение также включает антитела против СВ1, которые конкурируют за связывание с СВ1 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, М1, М2, М3, М4, М5 (и их гуманизованных вариантов), М6, М7 (и их гуманизованных вариантов) и М8).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против СВ1, или конкурирует за связывание с ним, с помощью стандартных способов, известных в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против СВ1 согласно изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком СВ1 (например, с растворимой частью внеклеточного домена СВ1 или с экспрессируемым на клеточной поверхности СВ1). Затем оценивается способность тестируемого антитела связываться с молекулой СВ1. Если тестируемое антитело

способно связываться с СВ1 после насыщения связывания с эталонным антителом против СВ1, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается эталонное антитело против СВ1. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой СВ1 после насыщения связывания с эталонным антителом против СВ1, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, с которым связывается эталонное антитело против СВ1. Затем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (например, анализ пептидных мутаций и связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается и эталонное антитело, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода можно проводить с помощью ИФА, РИА, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, как измерено при помощи анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al. (1990) *Cancer Res.* 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела считаются связывающимися с одним и тем же эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Считается, что два антитела имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только часть аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое способно конкурировать с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в данном документе, за связывание с СВ1. Такие антитела можно идентифицировать с помощью стандартных анализов конкурентного связывания. Например, чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом против СВ1, описанная выше методология связывания выполняется в двух ориентациях: В первой ориентации эталонному антителу позволяют связываться с белком СВ1 (например, с растворимой частью внеклеточного домена СВ1 или экспрессируемым на клеточной поверхности СВ1) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой СВ1. Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой СВ1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой СВ1. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой СВ1, то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с СВ1. Антитело, которое конкурирует за связывание с

эталонным антителом, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела, например, путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа. Конкуренция может быть измерена с помощью ИФА, проточной цитометрии или анализа поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Кроме того, анализы перекрестной конкуренции и эпитопного биннинга могут быть выполнены с использованием системы Octet HTX (Pall ForteBio LLC, Fremont, CA 94538).

В одном варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 32, 44, 56, 68, 80, 92, 104, 116, 128, 140, 152, 164, 176, 188, 200, 212, 224, 236, 248, 260, 272, 284, 296, 308, и 320. В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 33, 45, 57, 69, 81, 93, 105, 117, 129, 141, 153, 165, 177, 189, 201, 213, 225, 237, 249, 261, 273, 285, 297, 309, и 321. В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 34, 46, 58, 70, 82, 94, 106, 118, 130, 142, 154, 166, 178, 190, 202, 214, 226, 238, 250, 262, 274, 286, 298, 310, и 322. В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR1 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 38, 50, 62, 74, 86, 98, 110, 122, 134, 146, 158, 170, 182, 194, 206, 218, 230, 242, 254, 266, 278, 290, 302, 314, и 326. В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR2 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 39, 51, 63, 75, 87, 99, 111, 123, 135, 147, 159, 171, 183, 195, 207, 219, 231, 243, 255, 267, 279, 291, 303, 315, и 327. В другом

варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR3 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 40, 52, 64, 76, 88, 100, 112, 124, 136, 148, 160, 172, 184, 196, 208, 220, 232, 244, 256, 268, 280, 292, 304, 316, и 328.

CDR тяжелой и легкой цепей антител против CB1, предложенных в данном документе, могут быть независимо выбраны и сопоставлены с образованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего любые CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи; и любые CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из предложенных в данном документе антител. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей предложенных в данном документе антител также могут быть независимо выбраны и сопоставлены с образованием антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего любую тяжелую и легкую цепь из антител, предложенных в данном документе.

В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126, 138, 150, 162, 174, 186, 198, 210, 222, 234, 246, 258, 270, 282, 294, 306 и 318.

В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312 и 324.

В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 29, 41, 53, 65, 77, 89, 101, 113, 125, 137, 149, 161, 173, 185, 197, 209, 221, 233, 245, 257, 269, 281, 283, 305, и 317. В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%,

по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 35, 47, 59, 71, 83, 95, 107, 119, 131, 143, 155, 167, 179, 191, 203, 215, 227, 239, 251, 263, 275, 287, 299, 311, и 323.

В определенных вариантах осуществления антитела против CB1 или их антигенсвязывающие фрагменты, CDR, VH, VL, тяжелые цепи и/или легкие цепи содержат по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 2% или по меньшей мере около 1% консервативных вариантов аминокислот.

В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор CDR VH, имеющий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из (20, 21, 22); (32, 33, 34); (44, 45, 46); (56, 57, 58); (68, 69, 70); (80, 81, 82); (92, 93, 94); (104, 105, 106); (116, 117, 118); (128, 129, 130); (140, 141, 142); (152, 153, 154); (164, 165, 166); (176, 177, 178); (188, 189, 190); (200, 201, 202); (212, 213, 214); (224, 225, 226); (236, 237, 238); (248, 249, 250); (260, 261, 262); (272, 273, 274); (284, 285, 286); (296, 297, 298); (308, 309, 310); и (320, 321, 322).

В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор CDR VL, имеющий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: (26, 27, 28); (38, 39, 40); (50, 51, 52); (62, 63, 64); (74, 75, 76); (86, 87, 88); (98, 99, 100); (110, 111, 112); (122, 123, 124); (134, 135, 136); (146, 147, 148); (158, 159, 160); (170, 171, 172); (182, 183, 184); (194, 195, 196); (206, 207, 208); (218, 219, 220); (230, 231, 232); (242, 243, 244); (254, 255, 256); (266, 267, 268); (278, 279, 280); (290, 291, 292); (302, 303, 304); (314, 315, 316); и (326, 327, 328).

В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор VH/VL, содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/24, 30/36, 42/48, 54/60, 66/72, 78/84, 90/96, 102/108, 114/120, 126/132, 138/144, 150/156, 162/168, 174/180, 186/192, 198/204, 210/216, 222/228, 234/240, 246/252, 258/264, 270/276, 282/288, 294/300, 306/312 и 318/324.

В другом варианте осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор тяжелой и легкой цепей, имеющий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 17/23, 29/35, 41/47, 53/59, 65/71, 77/83, 89/95, 101/107, 113/119, 125/131, 137/143, 149/155, 161/167, 173/179, 185/191, 197/203, 209/215, 221/227, 233/239, 245/251, 257/263, 269/275, 281/287, 283/289, 305/311, и 317/323.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CB1 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CB1 и проявляет пониженную эффекторную

функцию, такую как, например, связывание Clq, комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ), связывание Fc-рецептора, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), фагоцитоз, опсонизация и трансцитоз. В одном варианте осуществления антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает СВ1 и имеет одну или более модификаций Fc-области, которые снижают, нарушают или устраняют одну или более эффекторных функций. Например, в одном варианте осуществления изобретения антитела против СВ1 и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, связывают СВ1, но демонстрируют сниженное, нарушенное или отсутствующее связывание Clq и/или КЗЦ, и/или АЗКЦ. Модификации Fc могут представлять собой вставки, делеции или замены аминокислот или могут быть химическими модификациями. Например, модификации Fc-области могут быть сделаны для увеличения или уменьшения связывания комплемента, для увеличения или уменьшения АЗКЦ или КЗЦ или для модификации гликозилирования. Различные модификации Fc известны в данной области техники и описаны, например, в Labrijn et al. (2009) *Nature Biotech.* 27(8):767-771; Greenwood et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:1098-1104; Mueller et al. (1997) *Mol. Immunol.* 34:441-452; и Rother et al. (2007) *Nature Biotechnol.* 25: 1256- 1264. Любая из модификаций Fc, известных в данной области техники, может быть применена к иллюстративным антителам к СВ1, описанным в данном документе, для изменения эффекторной функции. В одном из вариантов осуществления антитело против СВ1 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет определенные мутации, например, L234A/L235A («LALA»), S228P, A330S, P331S, E233P/L234V/L235A, A327G/A330S/P331S, L234F/L235E/P331S, и N297Q.

Предложенные в данном документе связывающие белки могут быть получены любым из ряда способов, известных в данной области техники. Например, экспрессия из клеток-хозяев, причем вектор(-ы) экспрессии, кодирующий связывающие СВ1 белки, трансфицируют в клетку-хозяина при помощи стандартных методик. Хотя возможно экспрессировать связывающие СВ1 белки, предложенные в данном документе, в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, клетки-хозяева млекопитающих с большей вероятностью, чем прокариотические клетки, будут собирать и секретировать правильно свернутый и иммунологически активный связывающий белок.

В иллюстративной системе для рекомбинантной экспрессии связывающих СВ1 белков рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела СВ1, вводят в клетки dhfr-СНО посредством опосредованной фосфатом кальция трансфекции. В рекомбинантном векторе экспрессии каждая из последовательностей тяжелой и легкой цепей антитела к СВ1 функционально связана с регуляторными элементами энхансера и промотора CMV для достижения высоких уровней транскрипции генов. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, который делает возможным селекцию клеток СНО, которые были трансфицированы вектором с использованием селекции/амплификации с помощью метотрексата. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы обеспечить

экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела к СВ1, и интактный белок антитела к СВ1 выделяют из культуральной среды. Стандартные методы молекулярной биологии используются для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и извлечения белка антитела к СВ1 из культуральной среды.

Биоэквиваленты

Антитела против СВ1 и фрагменты антител согласно данному описанию включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых описанных антител, но которые сохраняют способность связывать СВ1 человека. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК согласно данному изобретению, кодирующие антитело против СВ1, включают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с описанной последовательностью, но которые кодируют антитело против СВ1 или фрагмент антитела, которое является по существу биоэквивалентным антителу против СВ1 или фрагменту антитела согласно изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных и ДНК-последовательностей обсуждались выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значительной разницы при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, будь то единичные дозы или многократная доза. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, являются не важными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном употреблении, и считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

В одном варианте два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности. В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациенту можно произвести один или более замен между эталонным препаратом и биологическим препаратом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности, или уменьшения эффективности по сравнению с продолжением терапии без такой замены. В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или

механизмов действия при условии или условиях применения, в той мере, в какой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и *in vitro*. Показатели биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* с участием людей или на других млекопитающих, в котором концентрация антитела или одного или более его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировал с данными биодоступности у человека *in vivo* и позволял обоснованно прогнозировать их;

тест *in vivo* с участием людей или на других млекопитающих, в котором соответствующий краткосрочный фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и

в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое определяет безопасность, эффективность, биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител против СВ1 могут быть сконструированы, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител против СВ1, содержащие аминокислотные изменения, которые изменяют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Селективность видов и перекрестная реактивность видов

Данное изобретение также включает антитела против СВ1, которые связываются с СВ1 человека и с СВ1 от одного или более отличных от человека видов. Например, антитела против СВ1 согласно изобретению могут связываться с СВ1 человека и могут связываться с одним или более из СВ1 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макаки, мартышки, макаки-резуса или шимпанзе. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения антитела против СВ1 связываются с СВ1 человека, но не с СВ1 других видов.

Иммуноконъюгаты

Изобретение охватывает антитела против СВ1, конъюгированные с терапевтическим компонентом («иммуноконъюгат»), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксические агенты включают любой агент, который вреден для клеток. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники и описаны в данном документе.

Мультиспецифические связывающие белки

Антитела согласно данному изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические для более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al. (2004) *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Антитела против СВ1 согласно данному изобретению могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными соединениями, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с образованием биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Например, данное изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина специфично для человеческого СВ1 или его фрагмента, а другое плечо иммуноглобулина специфично для второй терапевтической мишени или конъюгировано с терапевтическим фрагментом.

Применение связывающих белков при различных заболеваниях

Антитела и связывающие белки согласно изобретению полезны для лечения, профилактики и/или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью СВ1, или поддаются лечению путем блокирования взаимодействия между СВ1 и лигандом СВ1 (например, каннабиноидом) или иным образом ингибирует активность и/или сигналинг СВ1, и/или способствует интернализации рецепторов и/или уменьшает количество рецепторов на поверхности клетки. Термин «нарушение, при котором активность СВ1 является вредной» означает нарушение или заболевание, при котором присутствие или активность (например, aberrантная или избыточная) СВ1 у субъекта, страдающего этим нарушением, или ответственны за патофизиологию нарушения или заболевания, или фактор, который способствует обострению нарушения или заболевания. Соответственно, нарушение, при котором активность СВ1 является пагубной, представляет собой нарушение, при котором ожидается, что снижение активности СВ1 облегчит симптомы и/или прогрессирование нарушения.

Предлагаемые в данном документе связывающие белковые молекулы полезны в качестве терапевтических молекул для лечения различных заболеваний или патологических состояний, например, когда белки СВ1 являются вредными. Например, связывающие молекулы, представленные в данном документе, включают любое заболевание или патологическое состояние, характеризующееся сверхэкспрессией, повышенным количеством или повышенной активностью или сигналингом СВ1, или отказом здоровых гомеостатических регуляторных механизмов, что может привести к этому. Такие заболевания и патологические состояния включают ожирение, синдромальное ожирение, включая синдром Прадера-Вилли, синдром Альстрёма,

синдром Барде-Биделя (СББ), наследственную остеодистрофию Олбрайта (НОО) и синдром делеции SIM1; диабет и связанные с ним осложнения; дислипидемию; заболевания печени, такие как, например, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), неалкогольная жировая болезнь печени и первичный билиарный цирроз; фиброз, например, фиброз почек; хроническое заболевание почек; почечная недостаточность; метаболические заболевания, остеопороз, атеросклероз, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, рак, боль, системный склероз, спастичность при рассеянном склерозе, глаукома и никотиновая зависимость.

Фармацевтические композиции

В изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие связывающий белок против СВ1, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Фармацевтические композиции согласно изобретению составлены с подходящими наполнителями, носителями, профилактическими агентами, терапевтическими агентами и другими агентами, которые улучшают стабильность, доставку, переносимость и эффективность связывающего белка против СВ 1. Множество подходящих составов можно найти в формуляре, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Карслбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердой смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. (1998) J. Pharm. Sci. Technol. 52: 238-311.

Фармацевтические композиции, содержащие связывающие СВ1 белки, предложенные в данном документе, предназначены для применения, но не ограничиваются ими, для диагностики, обнаружения или мониторинга нарушения, для предотвращения, лечения, контроля или облегчения нарушения или одного или более его симптомов и/или для применения в исследовании.

Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Композицию можно вводить любым удобным путем, например, инфузией или болюсной инъекцией, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и слизистую оболочку кишки и т. д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

Способы введения профилактического или терапевтического агента, предложенные в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, парентеральное введение

(например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное введение, внутриопухолевое введение, введение через слизистые оболочки (например, интраназальный и пероральный пути) и легочное введение (например, соединения в форме аэрозоля, вводимые с помощью ингалятора или распылителя). Составление фармацевтических композиций для конкретных путей введения, а также материалы и способы, необходимые для различных способов введения, доступны и известны специалисту в данной области техники.

Схемы приема лекарственного средства можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ (например, терапевтический или профилактический ответ). Например, может быть введена одноразовая доза, несколько разделенных доз могут вводиться с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как указано в зависимости от терапевтической ситуации. В частности, может быть выгодным приготовление парентеральных композиций в единичной дозированной форме для удобства введения и однородности дозировки. Термин «единичная дозированная форма» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных дозированных форм, предложенных в данном документе, продиктована и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, который должен быть достигнут, и (b) ограничений, присущих в данной области рецептуры, таких как активное соединение для лечения чувствительности у субъектов.

Фармацевтическая композиция согласно данному изобретению может быть введена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, шприце-ручке для доставки легко может найти применение при доставке фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Такая шприц-ручка для доставки может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприце-ручке для доставки, как правило, используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку для доставки можно использовать повторно. В одноразовой шприце-ручке для доставки сменный картридж отсутствует. Скорее, шприц-ручка для доставки поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Множество многоразовых шприцев-ручек и шприцев для самоинъекции могут применяться для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen

Mumford, Inc., г. Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, н. Бергдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., г. Индианаполис, штат Индиана, США), шприц-ручку NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, г. Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси, США), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™ OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, г. Франкфурт, Германия). Примеры одноразовых шприцев-ручек для доставки, применяемых при подкожной доставке фармацевтической композиции согласно данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц для самоинъекции SURECLICK™ (Amgen, Таузенд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, LP) и шприц-ручку HUMIRA™ (AbbVie, Inc., Абботт Парк, Иллинойс)

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос (Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201-240). В другом варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, FL). В другом варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, что требует лишь части системной дозы (Goodson (1984) in Medical Applications of Controlled Release, supra, 2: 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990) Science 249: 1527- 1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты можно приготовить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, как правило, используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла)) и т. д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т. д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. д. Приготовленной таким образом инъекции

предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в единичной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие дозированные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы указанное выше антитело содержалось от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других дозированных форм.

Доза антитела, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, стадии заболевания, пола, наличия медицинских осложнений, других лекарственных препаратов, патологических состояний, пути введения и т.п. Предпочтительная доза, как правило, рассчитывается в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда антитело согласно данному изобретению используется для лечения патологического состояния или заболевания, связанного с активностью СВ1 у взрослого пациента, может быть полезным внутривенное введение антитела согласно данному изобретению, как правило, в разовой дозе от около 0,01 до около 100 мг/кг массы тела. В зависимости от степени тяжести патологического состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения. Эффективные дозировки и схемы введения антител против СВ1 можно определить эмпирически; например, прогресс пациента можно контролировать путем периодической оценки, и дозу можно корректировать соответствующим образом. Более того, межвидовое приведение доз можно проводить с использованием хорошо известных в данной области техники способов (например, Mordenti et al. (1991) *Pharmaceut. Res.* 8: 1351-1359). Следует также понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные схемы применения могут корректироваться со временем в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным суждением лица, осуществляющего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны доз указанные в данном документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или практики заявленной композиции.

Комбинированная терапия

Предложенный в данном документе связывающий белок также можно вводить с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, полезными при лечении различных заболеваний, причем дополнительный агент выбирается квалифицированным специалистом по его прямому назначению. Например, дополнительный агент может быть терапевтическим агентом, признанным в данной области техники полезным для лечения заболевания или патологического состояния, которое лечится связывающими СВ1 белками, предложенными в данном документе. Комбинация также может содержать более одного дополнительного агента.

Неограничивающие примеры таких дополнительных терапевтически активных компонентов включают другие антагонисты CB1 (например, второе антитело против CB1 или низкомолекулярный ингибитор CB1 (например, римонабант, таранабант, AM251, AM1387, AM4113, каннабигерол, ибипинабант, отенабант, суринабант, тетрагидроканнабиварин, виродамин и AM6545), антагонист другого члена семейства CB1.

Данное изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любое из упомянутых в данном документе антител против CB1 и дополнительный ингибитор, причем ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, кРНК, пептитело, наноантитело или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F (ab')₂; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, миниантитела и минимальные единицы распознавания). Антитела против CB1 согласно изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами. Дополнительный терапевтически активный компонент(-ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения антитела против CB1 согласно данному изобретению; (для целей данного описания такие схемы введения рассматриваются как введение антитела против CB1 «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом). Данное изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело против CB 1 согласно данному изобретению составлено совместно с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте в данном документе.

Данное изобретение также включает композиции и способы, содержащие комбинацию «антитела-антагониста» и «антитела-обратного агониста». «Антитело-антагонист против CB1» означает антитело против CB1, которое ингибирует, снижает или предотвращает активность сигналинга лиганда (например, каннабиноида) в отношении CB1. Неограничивающими примерами антител-антагонистов согласно данному изобретению являются M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M7-N1, M7-N2, M7-N3, M7-N4, M7-N5, M7-N6, M7-N7, M7-N8, M7-N9, M7-N10, M7-N11, M7-N12, M7-N13, M7-N14, M7-N15, M7-N16, M5-N1, M5-N2. «Антитело-обратный агонист против CB1» означает антитело против CB1, которое вызывает фармакологический ответ, противоположный агонисту. Если агонист увеличивает активность рецептора выше его базального уровня, то обратный агонист снижает активность ниже базального уровня. Неограничивающие примеры антител-обратных агонистов согласно данному изобретению включают M7. Авторы данного изобретения задумали комбинировать антитело-антагонист и антитело-обратный агонист для синергического или иного повышения эффективности. Соответственно, данное изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело-антагонист и по меньшей мере одно антитело-обратный агонист. Данное изобретение также включает терапевтические способы, включающие введение субъекту комбинации антитела-антагониста и антитела-

обратного агониста (или в виде отдельных введений, или в виде совместных составов).

Агенты комбинированной терапии включают, но не ограничиваются ими, противоопухолевые агенты, лучевую терапию, химиотерапию, такую как ДНК-алкилирующие агенты, цисплатин, карбоплатин, агенты против тубулина, паклитаксел, доцетаксел, таксол, доксорубицин, гемцитабин, гемзар, антрациклины, адриамицин, ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II, 5-фторурацил (5-ФУ), лейковорин, иринотекан, ингибиторы рецепторной тирозинкиназы (например, эрлотиниб, gefitinib), ингибиторы COX-2 (например, целекоксиб), ингибиторы киназ и кинРНК.

Диагностика

Описание в данном документе обеспечивает диагностические применения, включая, но не ограничиваясь ими, методы диагностического анализа, диагностические наборы, содержащие один или более связывающих СВ1 белков, и адаптацию методов и наборов для применения в автоматизированных и/или полуавтоматических системах. Предложенные способы, наборы и адаптации могут использоваться для обнаружения, мониторинга и/или лечения заболевания или нарушения у индивидуума.

Антитела против СВ1 согласно данному изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения СВ1 или клеток, экспрессирующих СВ1, в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело против СВ1 или его фрагмент можно использовать для диагностики патологического состояния или заболевания, характеризующегося aberrantной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) СВ1. Иллюстративные диагностические анализы на СВ1 могут включать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом против СВ1 согласно изобретению, причем антитело против СВ1 мечено обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы немеченое антитело против СВ1 может быть использовано в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе является обнаруживаемой меткой. Подходящие обнаруживаемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, хемилюминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, люциферазу и ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин, флуоресцеин, дансил хлорид и фикоэритрин. Примером люминесцентного материала является люминол, а примеры подходящих радиоактивных материалов включают (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , и ^{153}Sm).

Иммуноанализы, предложенные в данном описании, могут включать сэндвич-иммуноанализы, радиоиммуноанализ (РИА), иммуноферментный анализ (ЕІА), иммуноферментный анализ (ІФА), иммуноанализы методом конкурентного

ингибирования, флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (FPIA), метод иммуноанализа с ферментативным усилением (EMIT), биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET), клеточную сортировку с активацией флуоресценции (FACS) и гомогенные хемилюминесцентные анализы, среди прочего.

Можно использовать хемилюминесцентный иммуноанализ на микрочастицах, для которого можно использовать автоматический анализатор ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Абботт Парк, Иллинойс).

Способы, использующие масс-спектрометрию, предусмотрены данным описанием и включают, но не ограничиваются этим, MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) или SELDI (усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация).

Способы сбора, транспортировки, обработки и анализа биологических тестируемых образцов с использованием иммуноанализов и масс-спектрометрии хорошо известны специалистам в данной области техники.

Наборы

Также предложен набор для анализа тестируемого образца на наличие, количество или концентрацию аналита или его фрагмента в тестируемом образце. Набор включает по меньшей мере один компонент для анализа тестируемого образца на аналит или его фрагмент, а также инструкции по анализу тестируемого образца на аналита или его фрагмента. По меньшей мере один компонент для анализа исследуемого образца на аналит или его фрагмент может содержать композицию, содержащую связывающий белок, как описано в данном документе, и/или связывающий белок против аналита (или фрагмент, вариант или фрагмент его варианта), который необязательно иммобилизован на твердой фазе.

Необязательно, набор может содержать калибратор или контроль, который может содержать выделенный или очищенный аналит. Набор может содержать по меньшей мере один компонент для анализа тестируемого образца на аналит с помощью иммуноанализа и/или масс-спектрометрии. Компоненты набора, включая аналит, связывающий белок и/или связывающий белок против аналита, или их фрагменты, могут быть необязательно помечены с использованием любой известной обнаруживаемой метки. Материалы и способы создания, предложенные на практике данного описания, будут известны специалисту в данной области техники.

Набор (или его компоненты), а также способ определения присутствия, количества или концентрации аналита в исследуемом образце с помощью анализа, такого как иммуноанализ, как описано в данном документе, можно адаптировать для использования в различных автоматизированных и полуавтоматических системах (включая те, в которых твердая фаза содержит микрочастицы), как описано, например, в патентах США №№ 5089424 и 5006309, а также в качестве коммерчески продаваемых систем, например, Abbott Laboratories (Абботт Парк, Иллинойс) как ARCHITECT®. Другие платформы, доступные от Abbott Laboratories, включают, но не ограничиваются ими, AxSYM®, IMx®

(см., например, патент США № 5294404, PRISM®, EIA (гранула) и Quantum™ II, а также другие платформы. Кроме того, анализы, наборы и компоненты набора можно использовать в других форматах, например, в электрохимических или других портативных или стационарных системах анализа. Данное описание, например, применимо к коммерческой системе электрохимического иммуноанализа Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories), при помощи которой выполняются сэндвич-иммуноанализы. Иммуносенсоры и способы их изготовления и работы в одноразовых тестовых устройствах описаны, например, в патентах США № 5063081, 7419821, 7682833, 7723099 и 9035027; и публикации США №№ 20040018577 и 20060160164.

Для специалистов в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации описанных в данном документе способов очевидны и могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов без выхода за рамки описанных в данном документе вариантов осуществления. После подробного описания определенных вариантов осуществления, практика изобретения будет более понятна из следующих примеров, которые представлены в данном документе только для иллюстрации и никоим образом не должны рассматриваться как ограничение изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение и селекция антител против CB1 для функциональной оценки

Мышей CD2F1 иммунизировали человеческим антигеном CB-1 в присутствии или в отсутствие антагониста CB-1 JD5037 (Cayman Chemical, Энн-Арбор, Мичиган, кат. № 1205), чтобы потенциально стабилизировать белок таким образом, чтобы он представлял себя в адекватной конформации во время иммунизации. Мышей иммунизировали в оба скакательных сустава примерно 5 мкг/30 мкл/скакательный сустав антигена с адъювантом Titer Max Gold (Сент-Луис, Миссури; Sigma Aldrich; кат. № T2684). Впоследствии мышей иммунизировали дважды в неделю CpG (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния; кат. № ODN1826) и Альгидрогелем (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния; кат. № vac-alu-250) в течение около 30 суток. Сыворотку собирали на 13-е и 26-е сутки для определения титра антител и его увеличения с течением времени. Мышей подвергали эвтаназии на 30-е сутки, подколенные и паховые лимфатические узлы собирали для слития и промывали в среде В (смесь RPMI 1640 1:1 (Thermo Fisher Scientific-Gibco, Сан-Диего, Калифорния; кат. № 11879020) и IMDM (Lonza, Анахайм, Калифорния; кат. № 12-722F) без добавления питательных веществ) и получали суспензии отдельных клеток. Миеломные клетки P3Ag8.563 (ATCC, Манассас, Вирджиния; кат. № PTA-9393) были собраны из культуры и промыты в среде В. Лимфоциты и миеломные клетки были смешаны в соотношении 1:1 и слиты с использованием аппарата для электрослияния BTX Harvard ECM 2001 (BTX Harvard Apparatus, Холлистон, Массачусетс; кат. № 45-0012). Слитые клетки ресуспендировали в среде для восстановления С (Stem Cell Technologies, Сизтл, Вашингтон; кат. № 03803) и оставляли для восстановления в Т-образной колбе на 75 см² в

течение ночи при 37 °С. На следующий день слитые клетки собирали и ресуспендировали в среде D с метилцеллюлозой для селекции гибридом (Stem Cell Technologies, Сизтл, Вашингтон; кат. № 03804), содержащей агент для обнаружения Anti-Mouse IgG-FITC CloneDetect (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния; кат. № K8220). Клетки смешивали и высевали из расчета 1×10^6 на 10 мл среды D. Высеванные клетки инкубировали при 37°С в течение 7 суток. Колонии гибридом собирали и переносили в 96-луночные планшеты для культивирования тканей, содержащие среду E для роста гибридом (Stem Cell Technologies, Сизтл, Вашингтон; кат. № 03805) с использованием Clone Pix2 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния) на основе размера колонии вместе с ее способностью отображать сильный ореол FITC, который указывал на продукцию IgG. Когда наблюдали макроскопические колонии, супернатанты подвергали скринингу на связывание клеток с использованием исходных клеток CHO и клеток, сверхэкспрессирующих CHO-huCB-1. Для этого первичного скрининга исходные гибридомные клетки CHO метят сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE) (Invitrogen, Анахайм, Калифорния; кат. № 34554) и смешивают с клетками, сверхэкспрессирующими CHO-huCB1, которые не мечены CFSE, для обеспечения эффективного и одновременного скрининга обеих линий клеток и для идентификации специфических для huCB-1 связывающих веществ. Клоны, которые специфически связывались с клетками, сверхэкспрессирующими CHO-huCB-1, и не связывались с исходными клетками CHO, отбирались и переносились для подтверждающего скрининга. Всего было отобрано 97 клонов для дальнейшей очистки в небольшом масштабе. Сводные данные по соответствующим слияниям и первичному скринингу приведены в таблице 2.

Таблица 2. Слияние клеток и первичный скрининг

	Кампания 9 Антиген huCB1 Иммунизация в скакательный сустав	Кампания 10 Антиген huCB1+JD5037 Иммунизация в скакательный сустав
Кол-во мышей	7	7
Лимфоциты	100×10^6	100×10^6
Слитые клетки	30×10^6	36×10^6
Скринированные гибридомы	-2400	-2880
Первичные huCB1-CHO- связывающие вещества	91	83
Подтвержденные huCB1-CHO- связывающие вещества	47	50
Клоны с перекрестной реактивностью moCB1-CHO	14	16

Пример 2. Очистка мышинных специфически связывающих клонов против huCB-1

Гибридомные клоны, отобранные на основании подтверждающего первичного скрининга, были дополнительно размножены в 50 мл среды с низким содержанием Ig (IMDM 1:1 (Lonza, Анахайм, Калифорния; кат. № 12-722F): среда F12-К Хэма (Gibco, Анахайм, Калифорния; кат. № 21127022) с 5% сывороткой с низким содержанием Ig (Invitrogen, Гранд-Айленд, Нью-Йорк; кат. № 1625007), содержащая 5 мл 100 мМ раствора пирувата натрия (Invitrogen, Гранд-Айленд, Нью-Йорк; кат. № 11360070), 5 мл 100 мМ заменимых аминокислот (Invitrogen, Гранд-Айленд, Нью-Йорк; кат. № 11140050) и 5 мл 100 мМ глутамина (Invitrogen, Гранд-Айленд, Нью-Йорк; кат. № 35050061)) в Т-образной колбе на 75 см² в течение 3-4 недель. Супернатанты собирали и очищали с использованием стандартных методов очистки с помощью протеина А.

Пример 3. Функциональная характеристика мышинных антител против CB1 в анализе цАМФ

Выделенные мышинные антитела против huCB-1 оценивали на их антагонистическую активность в анализе цАМФ. Анализы цАМФ проводили с использованием линии клеток cAMP HunterTM CHO-K1 CNR1 Gi (DiscoverX/Eurofins, Фремонт, Калифорния; кат. № 95-0071C2), которые сверхэкспрессируют природные сопряженные с Gi рецепторы, сопряженные с G-белком рецепторы дикого типа (GPCR), и предназначены для обнаружения увеличения внутриклеточных уровней цАМФ в ответ на стимуляцию рецептора агонистами. Клетки cAMP HunterTM CHO-K1 CNR1 Gi обрабатывали антителами к CB1, изотипическим контролем или низкомолекулярным антагонистом CB1 JD5037 с последующей стимуляцией 30 нМ агониста CP-55940 (обозначено как «Плюс CP») в присутствии форсколина. Антагонисты также тестировали без добавления CP-55940, чтобы установить, обладают ли они агонистической активностью. Форсколин активирует фермент аденилатциклазу и увеличивает внутриклеточные уровни цАМФ. Для рецептора Gi связывание агониста ингибирует внутриклеточное накопление цАМФ, вызванное форсколином. Таким образом, чтобы измерить сопряженные с Gi рецепторы, соединение-агонист CP-55940 было добавлено в присутствии форсколина. Таким образом, активация сопряженного с Gi рецептора ингибирует форсколин-индуцированную продукцию цАМФ, и, как результат, кривая доза-ответ, полученная в присутствии агониста с форсколином, будет иметь отрицательный наклон. Вкратце, клетки высевали в среду Cell Plating 2 (DiscoverX/Eurofins; Фремонт, Калифорния, кат. № 93-0563R2A) в количестве $1,5 \times 10^4$ клеток/лунку в 96-луночные планшеты (Costar, Fisher Scientific, Сан-Диего, Калифорния; кат. № 3909) и инкубировали в течение ночи при 37 °C, 5% CO₂. На следующий день культуральную среду заменяли 30 мкл буфера для анализа клеток (CAB; $1 \times \text{HBSS}/10 \text{ нМ HEPES}$ (ThermoFisher, Анахайм, Калифорния; кат. №№ 14025134 и 15630080, соответственно) и обрабатывали тестируемыми антителами или изотипическим контролем (7,5 мкл 6-кратного концентрированного рабочего разведения). Планшеты инкубировали в течение 30 минут при 37 °C, 5% CO₂. 7,5 мкл стимулирующего агониста (0,18 мкМ CP 55940 в CAB, содержащей 90 мкМ форсколина) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали

еще 30 минут при 37 °С, 5% CO₂. Планшеты обрабатывали для считывания цАМФ с использованием набора HitHunter® cAMP Assay Detection Kit для биопрепаратов (DiscoverX/Eurofins; Фремонт, Калифорния, кат. № 90-0075LM25) в соответствии с инструкциями изготовителя. Первоначальную оценку выделенных клонов проводили при разовой концентрации 30 пг/мл.

Из 112 протестированных клонов только восемь клонов проявили антагонистическую активность. Два клон показали некоторую степень антагонизма в отсутствие агониста МЗ и в меньшей степени М1. Восемь антител М1, М2, М3, М4, М5, М6, М7 и М8 дополнительно оценивали путем титрования концентрации Ат для получения кривых доза-ответ и фактических значений EC₅₀ (таблица 3 и Фиг. 1).

Пример 4. Функциональная характеристика мышинных антител против CB1 в анализе pERK

Восемь антител, которые были функциональными антагонистами в анализе цАМФ, дополнительно оценивали в анализе фосфорилирования pERK, проводимом с использованием линии клеток cAMP Hunter™ CHO-K1 CNR1 Gi (DiscoverX/Eurofins, Фремонт, Калифорния, кат. № 95-0071C2). Вкратце, клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 2×10⁴ клеток/лунку в полной среде для культивирования клеток для анализа из Kit-107 (DiscoverX/Eurofins, Фремонт, Калифорния, кат. № 92-3107G) плюс 800 пг/мл G418 и инкубировали при 37 °С, 5% CO₂. На следующий день культуральную среду заменяли 100 мкл/лунку бессывороточной минимальной среды F-12K (Invitrogen, Гранд-Айленд, Нью-Йорк; кат. № 11765054). Планшеты инкубировали еще один день при 37 °С, 5% CO₂. В день обработки среду F-12K заменяли 30 мкл/лунку свежей среды F-12K. Затем в лунки добавляли тестируемое антитело или изотипический контроль (7,5 мкл 6-кратного концентрированного рабочего разведения) и планшеты инкубировали в течение 10 минут при 37 °С, 5% CO₂. 7,5 мкл агониста (6-кратный рабочий раствор, содержащий 0,18 пМ CP 55940 в САВ с 90 пМ форсколина) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали еще 10 минут при 37 °С, 5% CO₂. Планшеты обрабатывали для определения p-ERK/общего ERK с использованием набора Meso Scale Discovery (MSD) (Meso Scale Discovery, Роквилл, Мэриленд; кат. № K15107D) в соответствии с инструкциями изготовителя (таблица 3 и Фиг. 2).

Таблица 3. Сводные данные по клеточному анализу мышинных антител против huCB-1

Антитело к CB1	цАМФ				P-ERK		
	Среднее цАМФ (% Amgen)	EC ₅₀ (нМ)			Среднее P- ERK (% ингиби- рования)	IC ₅₀ (нМ)	
		Набор данных 1	Данные Набор 2	Данные Набор 3		Набор данных 1	Данные Набор 2
M1	75	43	170	150	68	163	165
M2	49	380	340	270	59	219	211

M3	71	290	290	330	59	296	534
M4	41	180	320	430	70	97	890
M5	61	91	170	170	101	191	50
M6	21	310	290	640	42	144	300
M7	61	78	120	120	95	117	170
M8	29	96	190	370	64	36	47

Пример 5. EC50 связывания мышинных антител против СВ-1 с клетками CHO, сверхэкспрессирующими СВ-1

Связывание антител тестировали в анализе на основе клеточной сортировки с активацией флуоресценции (FACS) на способность мышинных антител против СВ1 связывать исходные клетки CHO, клетки CHO со сверхэкспрессией СВ-1 человека и клетки CHO со сверхэкспрессией СВ-1 мыши для получения кривых связывания и значений EC50. Три клеточные линии собирали, промывали и распределяли по 1×10^5 клеток на лунку 96-луночных планшетов для FACS из поликарбоната с V-образным дном (Corning, Корнинг, Нью-Йорк, кат. № 3357) в 50 мкл буфера для FACS (IX PBS/2 mM ЭДТК и 1% FBS (ThermoFisher Scientific, Анахайм, Калифорния; кат. № 10438-026). Серийные разведения антител готовили с 2-кратными концентрациями, начиная с 200 нМ, и серийно разбавляли в 3 раза. Титрированные антитела добавляли в планшеты, содержащие три разные линии клеток (исходные, человеческие и мышинные клетки CHO-1), и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. Планшеты промывали 3 раза буфером для FACS. Клетки ресуспендировали в 50 мкл разведения 1/5000 конъюгированного с ПХ козьего антитела против мышинного IgG (Jackson Immuno Research, Вест-Гроув, Пенсильвания; кат. № 115-035-003), инкубировали при 4°C в течение 30 минут, промывали 3 раза буфером для FACS и данные собирали на BD FACS Canto (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния; кат. № 338962) и анализировали с помощью FlowJo (FlowJo LLC, Ашленд, Орегон) (Таблица 4). Ни одно из восьми функциональных антител не было перекрестно реактивным у мышей (Фиг. 3).

Таблица 4. Мышинные клоны с аффинностью связывания сверхэкспрессирующих СВ1 клеток

Клон	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
EC50 (нМ)	15,7	34,72	61,62	19,19	20,16	43,52	12,97	10,66

Пример 6. Анализ EC50 функциональных антител против СВ-1 и оценка конформационного связывания

Цель этого эксперимента состояла в том, чтобы определить, обладают ли антитела-антагонисты против СВ1 дифференциальной способностью связывания с СВ1 при подтверждении нейтрального, антагонистического или агонистического состояния. Использовали четыре различных препарата линий клеток: CHO-huSV1 (полученный

самостоятельно в лаборатории), CHO-huCB1, предварительно инкубированный с обратным агонистом JD5037 (Cayman Chemicals, Энн-Арбор, Мичиган; кат. № 1392116-14-1), CHO-huCB1, предварительно инкубированный с агонистом CP-55940 (TOCRIS, Миннеаполис, Миннесота; кат. № 0949), и исходные клетки CHO-S (Thermo Fisher Scientific, Вирджиния; кат. № R80007). 2×10^7 исходных клеток CHO-S и CHO-hu CB1 помещали в буфер для FACS. Кроме того, 2×10^7 клеток CHO-huCB1, покрытых обратным агонистом JD5037 или агонистом CP-55940, инкубировали при 4°C в течение 1 часа. После инкубации эти две покрытые линии клеток промывали 2X в буфере для FACS и ресуспендировали при 2×10^7 в буфере для FACS, содержащем молекулы обратных агонистов или агонистов, соответственно. Все четыре линии клеток высевали на планшеты для FACS с V-образным дном (Corning, Корнинг, Нью-Йорк, кат. № 3357) и предварительно титрованные тестируемые антитела против CB1 добавляли к клеткам и оценивали на связывание с помощью BD FACS Canto (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния; кат. № 338962). Как показано на Фиг. 4, антитела не связывались с исходными клетками CHO (синяя кривая), указанные выше восемь функциональных Ат (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 и M8) не проявляли предпочтительного связывания. в присутствии агониста или антагониста, о чем свидетельствует связывание, наблюдаемое во всех условиях (красная, пурпурная и зеленая кривые). Только 2 тестируемых антитела, которые в остальном были нефункциональными в анализах цАМФ или pERK, показали предпочтительное связывание в присутствии антагониста и в отсутствие агониста, соответственно. Это предполагает, что функциональное антитело против CB1 может не быть связано со связывающей конформацией, которая возникает в присутствии известного агониста или антагониста рецептора.

Пример 7. Идентификация последовательности и анализ мышинных антител против CB1

Гибридомы восьми мышинных антител против huCB-1 собирали в виде осадка клеток, и супернатанты использовали для определения изотипа каждой из гибридом с использованием стандартного набора для ИФА для изотипирования мышинных антител (Pierce/ThermoFisher Scientific, Сан-Диего, Калифорния; кат. № 37503). Четыре антитела (M1, M3, M4 и M6) представляют собой IgG2a, K, а четыре из 5 антител (M2, M5, M7 и M8) представляют собой IgG2b, K. Осадки были обработаны для получения РНК и кДНК, и набор для амплификации SMARTER RACE (Clontech, Маунтин-Вью, Калифорния; кат. № 634859) использовали для обработки кДНК для секвенирования. Изотип каждого из антител использовали для создания обратных праймеров для константной области тяжелых цепей и константной области легкой цепи каппа, а полимеразы SeqAmp (CloneTech, Маунтин-Вью, Калифорния; кат. № 638504) в качестве прямого праймера. ПНК-праймер MOPC21 (синтезированный на основе последовательности) был включен для предотвращения амплификации аберрантной легкой цепи, которая часто появляется в процессе секвенирования и может мешать идентификации действительной последовательности варибельной области легкой цепи. Всего было идентифицировано 8

уникальных последовательностей и 7 уникальных семейств. Последовательности восьми клонов предложены в таблице 5. Консенсусная последовательность тяжелой и легкой цепей гибридных антител представлена на Фиг. 5А и 5В, соответственно.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности мышинных химерных антител с Fc человека против CB1

Шифр	Область белка	Аминокислотная последовательность 1234567890123456789012345678901234567890	SEQ ID NO
M1	HC	QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDHALHWVKQS QARS LEWIGIISTYYGDATYNQKFKGKATMTVDKS S S TAY MELARLTSEDSAFYYCARGGLYYGTNYRAMDYWGQGT SVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	17
	VH	QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDHALHWVKQS QARS LEWIGIISTYYGDATYNQKFKGKATMTVDKS S S TAY MELARLTSEDSAFYYCARGGLYYGTNYRAMDYWGQGT SVT VSS	18
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK	19
		EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	

	CDR-H1	GYTFTDHA	20
	CDR-H2	IISTYYGDA	21
	CDR-H3	ARGGLYYGTNYRAMDY	22
	LC	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGSNVAWYQQK P GQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS EDLAEYFCQQYNNYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	23
	VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGSNVAWYQQK P GQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS EDLAEYFCQQYNNYPFTFGSGTKLEIK	24
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	25
	CDR-L1	QNVGSN	26
	CDR-L2	SAS	27
	CDR-L3	QQYNNYPFT	28
M2	HC	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYTFTDYNMHWVKLG KS LEWIGYFYPDDGGSGYNQKFKGKATLTIDKS S S TAYME LHSLTSEDSAVYYCARGYGNSWGTYWGQGTLLTVSAAST K GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	29
	VH	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYTFTDYNMHWVKLG KS LEWIGYFYPDDGGSGYNQKFKGKATLTIDKS S S TAYME	30

		LHSLTSEDSAVYYCARGYGNSWGTYWGQGTSLTVSA	
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	31
	CDR-H1	GYTFTDYN	32
	CDR-H2	FYPDDGGS	33
	CDR-H3	ARGYGNSWGTY	34
	LC	EIVLTQS PTTMAAS PGEKITITCSASSRISSNYLYWYQQK	35
		PGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTME AEDVATYYCQQGSSIPYTFGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFP PSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	
	VL	EIVLTQS PTTMAAS PGEKITITCSASSRISSNYLYWYQQK PGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTME AEDVATYYCQQGSSIPYTFGGGTKLEIK	36
	CL	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	37
	CDR-L1	SRISSNY	38
	CDR-L2	RTS	39
	CDR-L3	QQGSSIPYT	40
M3	HC	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYEFTDYALHWVKQS HAE T LEWIGLITTYGDTNYNQKFKGKATMTVDKS S S TAY MELARLTSEDSAIYYCARGGYYYGTDYRYFDVWGAGTT VT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV	41

		TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
	VH	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYEFTDYALHWVKQS HAE T LEWIGL ITTYYGDT TNYNQKFKGKATMTVDKS S S TAY MELARLTSEDSAI YYCARGGYYYGTDYRYFDVWGAGTT VT VSS	42
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	43
	CDR-H1	GYEFTDYA	44
	CDR-H2	ITTYYGDT	45
	CDR-H3	ARGGYYYGTDYRYFDV	46
	LC	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRP NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVES EDIADYYCQQSITWPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	47
	VL	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRP NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVES EDIADYYCQQSITWPLTFGAGTKLELK	48

	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	49
	CDR-L1	QSIGTN	50
	CDR-L2	YAS	51
	CDR-L3	QQSITWPLT	52
M4	HC	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFNYYWMNWVKQ R PGQGLEWIGQIYPGDGDINYNKFKGKATLTSDKSSSTVY MQLSSLTSEDSAVYFCRSKGNPFAYWGQGTLVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	53
	VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFNYYWMNWVKQ R PGQGLEWIGQIYPGDGDINYNKFKGKATLTSDKSSSTVY MQLSSLTSEDSAVYFCRSKGNPFAYWGQGTLVTVSA	54
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	55
	CDR-H1	GYEFNYYW	56
	CDR-H2	IYPGDGDI	57
	CDR-H3	SRSKGNPFAY	58
	LC	DIQMTQTTSSLSASLGDSVTISCRASQGIRNYLNWYQQKP	59

		DGTVKLLIYYTSRLHSGVPPRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDLATYFCQQGNTLPYTFGGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDSVTISCRASQGIRNYLNWYQQKP DGTVKLLIYYTSRLHSGVPPRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDLATYFCQQGNTLPYTFGGGGTKLEIK	60
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	61
	CDR-L1	QGIRNY	62
	CDR-L2	YTS	63
	CDR-L3	QQGNTLPYT	64
M5	HC	QVHLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFSYYWMNWVKQ R	65
		PGQGHEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYFCARGREAAWFAYWGQGT LVTVSAA S TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLT VLVHLDWLNKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
	VH	QVHLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFSYYWMNWVKQ R PGQGHEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYFCARGREAAWFAYWGQGT LVTVSA	66
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	67

		PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
	CDR-H1	GYEFSYYW	68
	CDR-H2	IYPGDGDT	69
	CDR-H3	ARGREAAWFAY	70
	LC	DIVLAQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSSFRYSYLHWY QQKPGQPPRLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIH PVEEEDTATYFCQHSWEIPFTFGSGTKLEIKRRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	LC	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCQASENIASDLAWYQQKQ GKSPQLLVYDARNLADGVPSRFSGSGSGTHYSLNIHSLQS EDVARYYCQHYYGTPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASWCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	71
	VL	DIVLAQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSSFRYSYLHWY QQKPGQPPRLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIH PVEEEDTATYFCQHSWEIPFTFGSGTKLEIKR	
	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCQASENIASDLAWYQQKQ GKSPQLLVYDARNLADGVPSRFSGSGSGTHYSLNIHSLQS EDVARYYCQHYYGTPTFGAGTKLELK	72
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	73
	CDR-L1	QSVSSFRYSY	
	CDR-L1	ENIASD	74
	CDR-L2	YAS	
	CDR-L2	DAR	75

	CDR-L3	QHSWEIPFT	
	CDR-L3	QHYYGTPT	76
M6	HC	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNLHWVKHG KSLEWIGYIYPYDGDGTGYKQKFKGKATLTADKSSSTAYME LRSLTCEDSAVYYCARGYGNSWGAYWGQGTLVTVSAAST K GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	77
	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNLHWVKHG KSLEWIGYIYPYDGDGTGYKQKFKGKATLTADKSSSTAYME LRSLTCEDSAVYYCARGYGNSWGAYWGQGTLVTVSA	78
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	79
	CDR-H1	GYTFTDYN	80
	CDR-H2	IYPYDGDGT	81
	CDR-H3	ARGYGNSWGAY	82
	LC	EIVLTQSPTTMAASPGKITITCSATSSISSNYLHWYQQK PGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTME AEDVATYYCQQGSSIPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ	83

		GLSSPVTKSFNRGEC	
	VL	EIVLTQSPTTMAASPGKITITCSATSSISSNYLHWYQQK PGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTME AEDVATYYCQQGSSIPYTFGGGTKLEIK	84
	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	85
	CDR-L1	SSISSNY	86
	CDR-L2	RTS	87
	CDR-L3	QGSSIPYT	88
M7	HC	EVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVKQ R PEEGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKDKAILTVDKSS S TAY MQLSTLTSEDSAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTSTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTY	89
		ICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
	VH	EVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVKQ R PEEGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKDKAILTVDKSS S TAY MQLSTLTSEDSAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTSTVTVSS	90
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV	91

		LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
	CDR-H1	SYTFTRYW	92
	CDR-H2	IDPYDSET	93
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	94
	LC	DIQMSQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGFLSWLQLRP DGTIKRLIYAASSLD SGV PKRFRGSWSGSDYSLTISSLES EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVT KSFNRGEC	95
	VL	DIQMSQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGFLSWLQLRP DGTIKRLIYAASSLD SGV PKRFRGSWSGSDYSLTISSLES EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	96
	CL	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	97
	CDR-L1	QEISGF	98
	CDR-L2	AAS	99
	CDR-L3	LQYSSYPYT	100
M8	HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTDYWMHWVKQ R PGHGLEWIGEIYPSSGRANYNGNFKRKATLTVDKS S S TAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSRGNYLPYWGHGTPVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYIC NVNHHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	101
	VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTDYWMHWVKQ	102

		R	
		PGHGLEWIGEIYPSSGRANYNGNFKRKATLTVDKS S S TAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSRGNYLPYWGHGTPVTVSA	
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	103
	CDR-H1	GYTFTDYW	104
	CDR-H2	IYPSSGRA	105
	CDR-H3	ARSRGNYLPY	106
	LC	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTAGSTVSSSYLHWYQQR PGSSPKLWIYGTSNLAAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSE AEDAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	107
	VL	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTAGSTVSSSYLHWYQQR PGSSPKLWIYGTSNLAAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSE AEDAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEIK	108
	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	109
	CDR-L1	STVSSSY	110
	CDR-L2	GTS	111
	CDR-L3	HQYHRSPPT	112

Пример 8. Выбор мышинных антител против CB1 для гуманизации

На основании функциональных данных, мышинные клоны M7 и M5 против huCB-1 были отобраны для гуманизации с использованием прогностического инструмента для человеческого конструирования, полученного из пакета программного обеспечения PHEnon™ (Хома, Беркли, Калифорния) (патент США № 5766886). Последовательности

VH и VL для каждого клона были представлены в качестве искомых последовательностей, а выходные последовательности были созданы на основе ближайших совпадений зародышевой линии человека из базы данных Кабата. Перечень мутаций в каркасной области был создан для изменения последовательностей VH и VL в сторону совпадения каркасной области человека. Риск мутаций отдельных остатков оценивали с помощью ряда критериев (патент США № 5766886). В совокупности мутации были сгруппированы в пулы клонов «низкого риска»

и «среднего риска». Выходные последовательности и введенные мутации были подтверждены *in silico* посредством моделирования гомологии. Конечные гуманизированные последовательности VH и VL антител клонировали в остов вектора человеческого IgG1 (вектор TCAL DGV), экспрессировали в клетках CHO и очищали с помощью аффинной хроматографии на протеине А в соответствии со стандартными способами. Последовательности гуманизированных клонов представлены в таблице 6. Консенсусная последовательность тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител M7 и M5 представлена на Фиг. 6А и 6В, соответственно.

Таблица 6. Аминокислотные последовательности гуманизированных антител к CB1

Шифр	Область белка	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
		1234567890123456789012345678901234567890	
M7-H1	HC	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSEDТАVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGТАALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	113
	VH	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSEDТАVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	114
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGТАALGCLVKDYFPEPVTVS	115

		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
	CDR-H1	SYTFTRYW	116
	CDR-H2	IDPYDSET	117
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	118
	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	119
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	120
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	121
	CDR-L1	QEISGF	122
	CDR-L2	AAS	123
	CDR-L3	LQYSSYPYT	124
M7-H2	HC	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSEDTAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY	125

		VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
	VH	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSEDTA VYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	126
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	127
	CDR-H1	SYTFTRYW	128
	CDR-H2	IDPYDSET	129
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	130
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKVEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	131
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKVEIK	132
	CL	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	133
	CDR-L1	QEISGF	134

	CDR-L2	AAS	135
	CDR-L3	LQYSSYPYT	136
M7-H3	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSETHYNQKFQGRATLTVDSTSTVY MELSSLRSEDТАVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK	137
		EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR.DE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSETHYNQKFQGRATLTVDSTSTVY MELSSLRSEDТАVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	138
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	139
	CDR-H1	SYTFTRYW	140
	CDR-H2	IDPYDSET	141
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	142
	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPP	143

		SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGGTKLEIK	144
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	145
	CDR-L1	QEISGF	146
	CDR-L2	AAS	147
	CDR-L3	LQYSSYPYT	148
M7- H4	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASSYTFTRYWMNWVKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSETHYNQKFQGRATLTVD TSTSTVY MELSSLRSED TAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLT VLVH QDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	149
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFKDRVTMTRDT S T S TVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTSVT VSS	150
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT V S WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLT VLVH QDWLNGK	151

		EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	CDR-H1	SYTFTRYW	152
	CDR-H2	IDPYDSET	153
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	154
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKPGKAIRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQPEDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	155
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKPGKAIRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQPEDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKVEIK	156
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	157
	CDR-L1	QEISGF	158
	CDR-L2	AAS	159
	CDR-L3	QYSSYPYT	160
M7-H5	HC	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVKQA PGQGLEWIG MIDPYDSE THYNQKFKDKAILTVDKST STAY MELSTLRSEDTAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ	161

		KSLSLSPGK	
	VH	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKDKAILTVDKS T S TAY MELSTLRSED TAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTSTVTVSS	162
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT	163
		QKSLSLSPGK	
	CDR-H1	SYTFTRYW	164
	CDR-H2	IDPYDSET	165
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	166
	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLRP DGTIKRLIYAASSLD SGVPSRFRGSWSGTDYTLTISSLQS EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	167
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLRP DGTIKRLIYAASSLD SGVPSRFRGSWSGTDYTLTISSLQS EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	168
	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	169
	CDR-L1	QEISGF	170
	CDR-L2	AAS	171
	CDR-L3	LQYSSYPYT	172
M7-H6	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFKDRVTMTRDT S T S	173

		TVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTSTVTVSS A STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTY ICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFKDRVTMTRDT S T S TVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTSTVTVSS	174
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	175
	CDR-H1	SYTFTRYW	176
	CDR-H2	IDPYDSET	177
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	178
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGFLAWFQQKP GKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQYSSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQ	179
		ESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGFLAWFQQKP	180

		GKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGGGKLEIK	
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	181
	CDR-L1	QEISGF	182
	CDR-L2	AAS	183
	CDR-L3	QQYSSYPYT	184
M7-H7	HC	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQ A PGQGLEWIG MIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSED TAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTY ICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	185
	VH	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQ A PGQGLEWIG MIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSED TAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	186
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	187

	CDR-H1	SYTFTRYW	188
	CDR-H2	IDPYDSET	189
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	190
	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQG LSSPVT KSFNRGEC	191
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	192
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFY PREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	193
	CDR-L1	QEISGF	194
	CDR-L2	AAS	195
	CDR-L3	LQYSSYPYT	196
M7- H8	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWIGMIDPYDSETHYNQKFQGRATLTVD TSTSTAY MELSSLRSED TAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVT VSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLT VLVHLDWLNQKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	197
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWIGMIDPYDSETHYNQKFQGRATLTVD TSTSTAY	198

		MELSSLRSED TAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	199
	CDR-H1	SYTFTRYW	200
	CDR-H2	IDPYDSET	201
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	202
	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	203
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	204
	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	205
	CDR-L1	QEISGF	206
	CDR-L2	AAS	207
	CDR-L3	LQYSSYPYT	208
M7- H9	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFQGRVTMTRDT S T S TVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS A STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTY	209

		ICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFQGRVTMTRDT S T S TVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	210
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	211
	CDR-H1	SYTFTRYW	212
	CDR-H2	IDPYDSET	213
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	214
	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	215
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	216
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE	217

		KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	CDR-L1	QEISGF	218
	CDR-L2	AAS	219
	CDR-L3	LQYSSYPYT	220
M7-H10	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVKQ R PGEGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFQGKVTMTVDKS S S TVY MELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTY ICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	221
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVKQ R	222
		PGEGLEWMGMIDPYDSETHYNQKFQGKVTMTVDKS S S TVY MELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	223
	CDR-H1	SYTFTRYW	224
	CDR-H2	IDPYDSET	225
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	226

	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQG LSSPVT KSFNRGEC	227
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	228
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	229
	CDR-L1	QEISGF	230
	CDR-L2	AAS	231
	CDR-L3	LQYSSYPYT	232
M7- HII	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGIIDPYDSETSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS A STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	233
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGIIDPYDSETSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	234
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	235

		YICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK	
		EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR.DE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
	CDR-H1	SYTFTRYW	236
	CDR-H2	IDPYDSET	237
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	238
	LC	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	239
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKTIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGGTKLEIK	240
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	241
	CDR-L1	QEISGF	242
	CDR-L2	AAS	243
	CDR-L3	LQYSSYPYT	244
M7- H12	HC	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSEDTAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTY ICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE	245

		YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
	VH	QVQLVQSGAEWKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVKQ A PGQGLEWIGMIDPYDSE THYNQKFKGKATLTVDKS T S TAY MELSSLRSEDTA VYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	246
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	247
	CDR-H1	SYTFTRYW	248
	CDR-H2	IDPYDSET	249
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	250
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	251
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	252
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	253
	CDR-L1	QEISGF	254
	CDR-L2	AAS	255

	CDR-L3	LQYSSYPYT	256
M7-H13	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVRQA PGQGLEWIGMIDPYDSETHYNQKFQGRATLTVDSTSTAY MELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	257
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWVRQA PGQGLEWIGMIDPYDSETHYNQKFQGRATLTVDSTSTAY MELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	258
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	259
	CDR-H1	SYTFTRYW	260
	CDR-H2	IDPYDSET	261
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	262
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYE	263

		KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQEISGFLSWLQLKP	264
		GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGKLEIK	
	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	265
	CDR-L1	QEISGF	266
	CDR-L2	AAS	267
	CDR-L3	LQYSSYPYT	268
M7- H14	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFQGRVTMTRDT S T S TVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS A STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	269
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFQGRVTMTRDT S T S TVY MELSSLRSED TAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	270
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV	271

		LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
	CDR-H1	SYTFTRYW	272
	CDR-H2	IDPYDSET	273
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	274
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	275
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGG TKLEIK	276
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	277
	CDR-L1	QEISGF	278
	CDR-L2	AAS	279
	CDR-L3	LQYSSYPYT	280
M7- H15	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASSYTFTRYWMNWVKQ R PGEGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFQGKVTMTVDKS S S TVY MELSSLRSED TAVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTY ICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	281
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASSYTFTRYWMNWVKQ	282

		R PGEGLEWMGMIDPYDSE THYNQKFQGKVTMTVDKS S S TVY MELSSLRSEDТАVYFCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	283
	CDR-H1	SYTFTRYW	284
	CDR-H2	IDPYDSET	285
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	286
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTCRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	287
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTCRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK	288
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	289
	CDR-L1	QEISGF	290
	CDR-L2	AAS	291
	CDR-L3	LQYSSYPYT	292
M7- H16	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGIIDPYDSETSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDТАVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	293

		A STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE	
		YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSYTFTRYWMNWVRQ A PGQGLEWMGIIDPYDSETSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDNAVYYCARSQPRYYAMDYWGQGTTVTVSS	294
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	295
	CDR-H1	SYTFTRYW	296
	CDR-H2	IDPYDSET	297
	CDR-H3	ARSQPRYYAMDY	298
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	299
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCSRASQEISGFLSWLQLKP GKAIKRLIYAASSLD SGVPSRFSGSWSGTDYTLTISSLQP EDFADYYCLQYSSYPYTFGGGKLEIK	300

	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	301
	CDR-L1	QEISGF	302
	CDR-L2	AAS	303
	CDR-L3	LQYSSYPYT	304
M5-H1	HC	QVQLVQS GAE WKPGAS VKIS CKAS GYE FSYYWMNWVKQA PGQGHEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSTSTAY MELSSLRSEDТАVYFCARGREAAWFAYWGQGTЛTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	305
	VH	QVQLVQS GAE WKPGAS VK IS CKAS GYE FSYYWMNWVKQA PGQGHEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSTSTAY MELSSLRSEDТАVYFCARGREAAWFAYWGQGTЛTVSS	306
	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	307
	CDR-H1	GYEFSYYW	308
	CDR-H2	IYPGDGDT	309

	CDR-H3	ARGREAAWFAY	310
	LC	DIQLTQSPSSLSVSVGDRATITCRASQSVSSFRYSYLHWY QQKPGKAPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SVQPEDFATYFCQHSWEIPFTFGQGGTKLEIKRTVAAPS VF IFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	311
	VL	DIQLTQSPSSLSVSVGDRATITCRASQSVSSFRYSYLHWY QQKPGKAPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SVQPEDFATYFCQHSWEIPFTFGQGGTKLEIK	312
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	313
	CDR-L1	QSVSSFRYSY	314
	CDR-L2	YAS	315
	CDR-L3	QHSWEIPFT	316
M5-H2	HC	QVQLVQS GAEVKKPGASVKVS CKAS GYE FSYYWMNWVRQA PGQGHEWIGQIYPGDGDTNYNQKFQGRVTLTADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYFCARGREAAWFAYWGQGT LVT VSS AS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLT VLVH QDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	317
	VH	QVQLVQS GAEVKKPGASVKVS CKAS GYE FSYYWMNWVRQA PGQGHEWIGQIYPGDGDTNYNQKFQGRVTLTADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYFCARGREAAWFAYWGQGT LVT VSS	318

	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT	319
		QKSLSLSPGK	
	CDR-H1	GYEFSYYW	320
	CDR-H2	IYPGDGDT	321
	CDR-H3	ARGREAAWFAY	322
	LC	DIQLTQSPSSLSVSVGDRATITCRASQSVSSFRYSYLHWY QQKPGKAPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SVQPEDFATYFCQHSWEIPFTFGQGGTKLEIKRTVAAPS VF IFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	323
	VL	DIQLTQSPSSLSVSVGDRATITCRASQSVSSFRYSYLHWY QQKPGKAPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SVQPEDFATYFCQHSWEIPFTFGQGGTKLEIK	324
	CL	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	325
	CDR-L1	QSVSSFRYSY	326
	CDR-L2	YAS	327
	CDR-L3	QHSWEIPFT	328

Пример 9. Повторная оценка гуманизированных антител против CB1 в анализах клеточного связывания и функциональных анализах

Гуманизированные варианты против CB 1 повторно оценивали на предмет их способности связывать клетки CHO-huCB-1 и сравнивали с исходными мышинными клонами M5 и M7 (Фиг. 7А и 7В), чтобы гарантировать сохранение связывания. Используемые условия анализа были аналогичны описанным в Примере 5. После анализа связывания тестируемые варианты также оценивали на антагонистическую функцию в анализах цАМФ и pERK согласно Примерам 3 и 4 (Фиг. 8А, 8В, 9А и 9В), чтобы гарантировать, что связывание и активность сохраняются после гуманизации. Все клоны

сохранили свою связывающую и антагонистическую активность. На Фиг. 10 показан обратный агонизм, проявляемый гуманизированными форматами антител М7-Н5 против СВ1 и IgG2b.

Эквиваленты

Описание может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не как ограничивающие описание. Следовательно, объем описания указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны быть включены в ее объем.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) (SEQ ID NO: 1), причем связывающий белок содержит шесть определяющих комплементарность областей (CDR): CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, при этом

CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность G-Y-T-F-T-D-Y-W (остатки 26-33 SEQ ID NO: 329) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, при этом замена G в положении 1 представляет собой S; замена T в положении 3 представляет собой E; замена T в положении 5 представляет собой S или N; замена D в положении 6 представляет собой R или Y; замена Y в положении 7 представляет собой H; и замена W в положении 8 представляет собой A или N;

CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность I-Y-P-Y-D-G-D-T (остатки 51-58 SEQ ID NO: 329) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, при этом замена I в положении 1 представляет собой F; замена Y в положении 2 представляет собой D, S или T; замена P в положении 3 представляет собой T; замена Y в положении 4 представляет собой G, D или S; замена D в положении 5 представляет собой Y или S; замена G в положении 6 представляет собой S; замена D в положении 7 представляет собой E, G или R; и замена T в положении 8 представляет собой A, S или I;

CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность A-R-G-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-W-X10-X11-Y (остатки 98-113 SEQ ID NO: 329) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, при этом замена A в положении 1 представляет собой S; замена G в положении 3 представляет собой S; X₁ в положении 4 представляет собой Q, Y, K, R или G, или отсутствует; X₂ в положении 5 представляет собой E, Y, L или G, или отсутствует; X₃ в положении 6 представляет собой Y или P или отсутствует; X₄ в положении 7 представляет собой Y, R или E, или отсутствует; X₅ в положении 8 представляет собой G или отсутствует; X₆ в положении 9 представляет собой T или отсутствует; X₇ в положении 10 представляет собой N или D, или отсутствует; X₈ в положении 11 представляет собой Y, N, A или G, или отсутствует; X₉ в положении 12 представляет собой N, Y, S, A или R, или отсутствует; замена W в положении 13 представляет собой Y, A или P; X₁₀ в положении 14 представляет собой L, M, F или G, или отсутствует; X₁₁ в положении 15 представляет собой P, D, A или T, или отсутствует; замена Y в положении 16 представляет собой V;

CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность Q-X₁-I-S-S-X₂-Y (остатки 27-33 SEQ ID NO: 330) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, при этом замена Q в положении 1 представляет собой S или E; X₁ в положении 2 представляет собой E, S, T, N, G или R; замена I в положении 3 представляет собой V; замена S в положении 4

представляет собой A, R или G; замена S в положении 5 представляет собой G, N или T; X₂ в положении 6 представляет собой S, N, пептид F- R-Y-S, или отсутствует; и замена Y в положении 7 представляет собой F, D или N;

CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность: X₁-T-S (остатки 51-53 SEQ ID NO: 330) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, при этом X₁ в положении 1 представляет собой A, Y, G, R, D или S; замена T в положении 2 представляет собой A; замена S в положении 3 представляет собой R; и

CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность: Q-Q-Y-X₁-S-X₂-P-Y-T (остатки 91-99 SEQ ID NO: 330) или модификацию указанной аминокислотной последовательности путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, причем замена Q в положении 1 представляет собой L или H; замена Q в положении 2 представляет собой H; замена Y в положении 3 представляет собой S или G; X₁ в положении 4 представляет собой S, W, H, Y, N или I; замена S в положении 5 представляет собой E, R, G, T или N; X₂ в положении 6 представляет собой Y, I, S, T, L или W; и замена Y в положении 8 представляет собой P, L, F или отсутствует; и при этом указанная замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка не ингибирует способность указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CB1 человека.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) (SEQ ID NO: 1) причем антитело содержит CDR последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и CDR последовательности вариабельного домена легкой цепи (VL), при этом последовательность домена VH выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126, 138, 150, 162, 174, 186, 198, 210, 222, 234, 246, 258, 270, 282, 294, 306 и 318, и/или причем домен VL выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312 и 324.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) (SEQ ID NO: 1), причем антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и последовательность вариабельного домена легкой цепи (VL), при этом последовательность домена VH выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126, 138, 150, 162, 174, 186, 198, 210, 222, 234, 246, 258, 270, 282, 294, 306 и 318, и/или причем домен VL выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312 и 324.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепей пары VH/VL, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/24, 30/36, 42/48, 54/60,

66/72, 78/84, 90/96, 102/108, 114/120, 126/132, 138/144, 150/156, 162/168, 174/180, 186/192, 198/204, 210/216, 222/228, 234/240, 246/252, 258/264, 270/276, 282/288, 294/300, 306/312 и 318/324.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару VH/VL, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 18/24, 30/36, 42/48, 54/60, 66/72, 78/84, 90/96, 102/108, 114/120, 126/132, 138/144, 150/156, 162/168, 174/180, 186/192, 198/204, 210/216, 222/228, 234/240, 246/252, 258/264, 270/276, 282/288, 294/300, 306/312 и 318/324.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор HCDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), выбранный из группы, состоящей из (20, 21, 22); (32, 33, 34); (44, 45, 46); (56, 57, 58); (68, 69, 70); (80, 81, 82); (92, 93, 94); (104, 105, 106); (116, 117, 118); (128, 129, 130); (140, 141, 142); (152, 153, 154); (164, 165, 166); (176, 177, 178); (188, 189, 190); (200, 201, 202); (212, 213, 214); (224, 225, 226); (236, 237, 238); (248, 249, 250); (260, 261, 262); (272, 273, 274); (284, 285, 286); (296, 297, 298); (308, 309, 310); и (320, 321, 322), и набор LCDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), выбранный из группы, состоящей из (26, 27, 28); (38, 39, 40); (50, 51, 52); (62, 63, 64); (74, 75, 76); (86, 87, 88); (98, 99, 100); (110, 111,

112); (122, 123, 124); (134, 135, 136); (146, 147, 148); (158, 159, 160); (170, 171, 172); (182, 183, 184); (194, 195, 196); (206, 207, 208); (218, 219, 220); (230, 231, 232); (242, 243,

244); (254, 255, 256); (266, 267, 268); (278, 279, 280); (290, 291, 292); (302, 303, 304); (314, 315, 316); и (326, 327, 328).

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару (набор HCDR/набор LCDR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: (20, 21, 22/ 26, 27, 28); (32, 33, 34/ 38, 39, 40); (44, 45, 46/ 50, 51, 52); (56, 57, 58/ 62, 63, 64); (68, 69, 70/ 74, 75, 76); (80, 81, 82/ 86, 87, 88); (92, 93, 94/ 98, 99, 100); (104, 105, 106/ 110, 111, 112); (116, 117, 118/ 122, 123, 124); (128, 129, 130/ 134, 135, 136); (140, 141, 142/ 146, 147, 148); (152, 153, 154/ 158, 159, 160); (164, 165, 166/ 170, 171, 172); (176, 177, 178/ 182, 183, 184); (188, 189, 190/ 194, 195, 196); (200, 201, 202/ 206, 207, 208); (212, 213, 214/ 218, 219, 220); (224, 225, 226/ 230, 231, 232); (236, 237, 238/ 242, 243, 244); (248, 249, 250/ 254, 255, 256); (260, 261, 262/ 266, 267, 268); (272, 273, 274/ 278, 279, 280); (284, 285, 286/ 290, 291, 292); (296, 297, 298/ 302, 303, 304); (308, 309, 310/ 314, 315, 316) и (320, 321, 322/ 326, 327, 328).

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару HC/LC, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17/23, 29/35, 41/47, 53/59, 65/71, 77/83, 89/95, 101/107, 113/119, 125/131, 137/143, 149/155, 161/167, 173/179, 185/191, 197/203, 209/215, 221/227, 233/239, 245/251, 257/263, 269/275, 281/287, 283/289, 305/311 и 317/323.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает человеческий каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1) (SEQ ID NO: 1), причем

антитело содержит CDR последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и CDR последовательности вариабельной области легкой цепи (VL), при этом последовательность домена VH имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126, 138, 150, 162, 174, 186, 198, 210, 222, 234, 246, 258, 270, 282, 294, 306 и 318, и/или последовательность домена VL, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312 и 324.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 114, а VL приведен в SEQ ID NO: 120.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 126, а VL приведен в SEQ ID NO: 132.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 138, а VL приведен в SEQ ID NO: 144.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 150, а VL приведен в SEQ ID NO: 156.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 162, а VL приведен в SEQ ID NO: 168.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 174, а VL приведен в SEQ ID NO: 180.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 186, а VL приведен в SEQ ID NO: 192.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 198, а VL приведен в SEQ ID NO: 204.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 210, а VL приведен в SEQ ID NO: 216.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 222, а VL приведен в SEQ ID NO: 228.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 234, а VL приведен в SEQ ID NO: 240.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 246, а VL приведен в SEQ ID NO: 252.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 258, а VL приведен в SEQ ID NO: 264.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 270, а VL приведен в SEQ ID NO: 276.

24. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 282, а VL приведен в SEQ ID NO: 288.

25. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором

VH приведен в SEQ ID NO: 294, а VL приведен в SEQ ID NO: 300.

26. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 306, а VL приведен в SEQ ID NO: 312.

27. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором VH приведен в SEQ ID NO: 318, а VL приведен в SEQ ID NO: 324.

28. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, в котором указанное антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-28, в котором фрагмент включает фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab)₂ или фрагмент scFv.

30. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, и IgM.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит модифицированную Fc-область человека.

32. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 31, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит модифицированную Fc-область человека, содержащую мутацию, выбранную из группы, состоящей из L234A/L235A, S228P, A330S, P331S, E233P/L234V/L235A, A327G/A330S/P331S, L234F/L235E/P331S и N297Q.

33. Мультиспецифический связывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32.

34. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-33, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность сигналинга CB1.

35. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-33, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает или активирует активность сигналинга CB1.

36. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-33, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является обратным агонистом по отношению к активности сигналинга CB1.

37. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-36, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

38. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-36, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является полностью человеческим антителом.

39. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за связывание с СВ1 с выделенным антителом против СВ1 человека или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-38.

40. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 39, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за связывание, представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается по существу с тем же эпитопом СВ1, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-38.

42. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 41, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается по существу с тем же эпитопом СВ1, представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

43. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с каннабиноидным рецептором 1-го типа (СВ1), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет K_d аффинности связывания для СВ1 около 1 мкМ или менее.

44. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 43, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет K_d аффинности связывания для СВ1 около 100 нМ или менее.

45. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-44, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляет уменьшенное проникновение в мозг по сравнению с римонабантом.

46. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-44, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует сигналинг СВ1 по меньшей мере в 2 раза больше по сравнению с римонабантом.

47. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-44, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляет уменьшенные побочные эффекты со стороны ЦНС по сравнению с римонабантом.

48. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-47.

49. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 48.

50. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 49.

51. Способ модуляции сигналинга СВ1, включающий приведение в контакт клетки, экспрессирующей СВ1, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-47.

52. Способ вызова антагонизма СВ1, включающий приведение в контакт клетки, экспрессирующей СВ1, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-47.

53. Способ вызова агонизма СВ1, включающий приведение в контакт клетки,

экспрессирующей CB1, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-47.

54. Способ вызова обратного агонизма CB1, включающий приведение в контакт клетки, экспрессирующей CB1, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-47.

55. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-47 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

56. Способ ингибирования биологической активности CB1 у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 55, тем самым ингибируя активность белка CB1 у субъекта.

57. Способ лечения заболевания, связанного с активностью CB1, включающий введение фармацевтической композиции по п. 55 субъекту, страдающему этим заболеванием.

58. Способ лечения заболевания или нарушения, отвечающего на модуляцию сигналинга CB1, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение фармацевтической композиции по п. 55.

59. Способ лечения заболевания или нарушения, отвечающего на антагонизм или обратный агонизм сигналинга CB1, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по п. 55.

60. Способ лечения заболевания или нарушения, отвечающего на агонизм сигналинга CB1, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по п. 55.

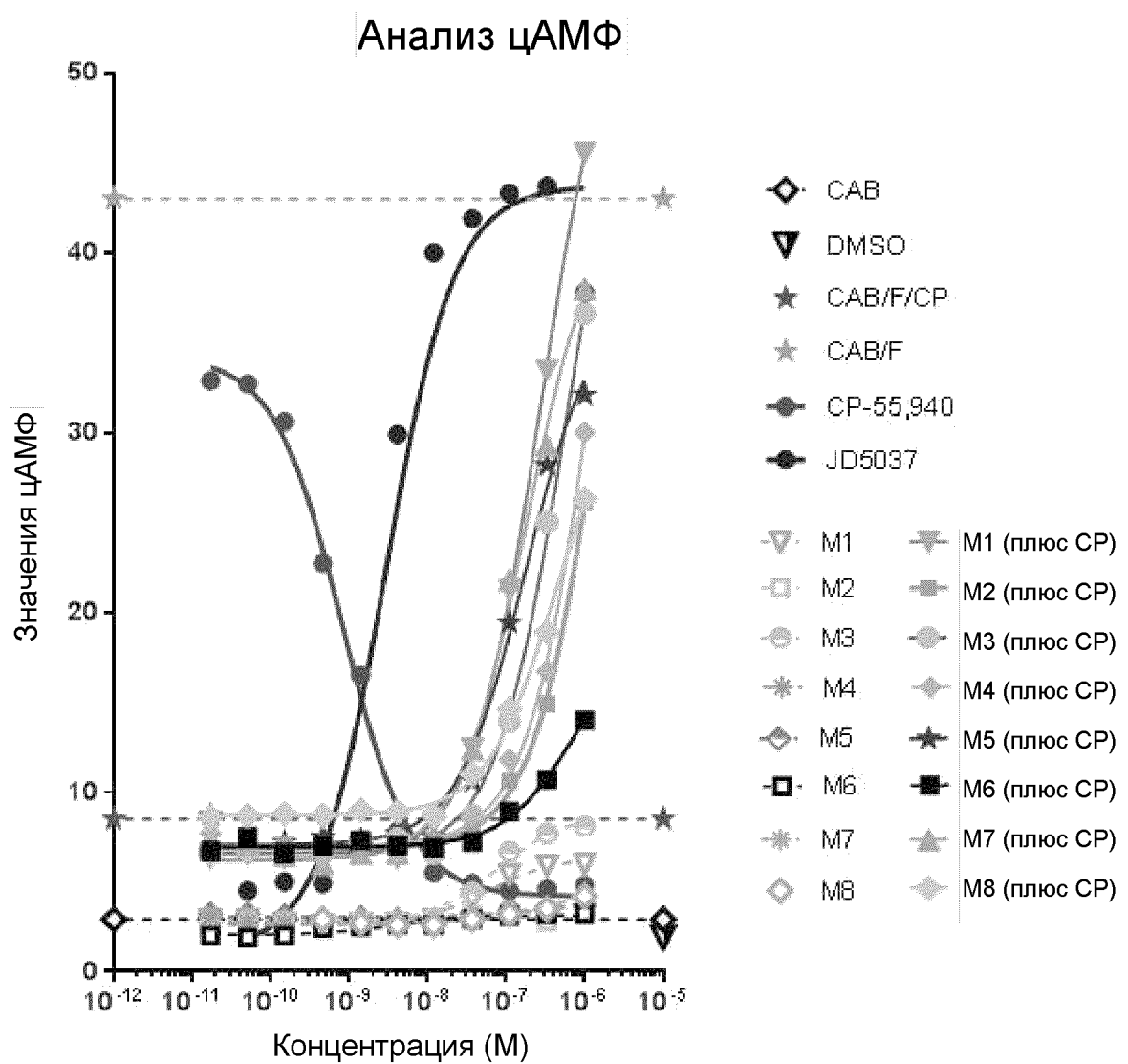
61. Способ диагностики заболевания или нарушения, связанного с CB1, включающий приведение в контакт клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-47.

62. Способ по п. 61, в котором заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из ожирения, синдромальных ожирений, включая синдром Прадера-Вилли (СПВ), синдром Альстрома, синдром Барде-Биделя (СББ), наследственную остеодистрофию Олбрайта (НОО) и синдром делеции SIM1; диабета и связанных с ним осложнений; дислипидемии; заболеваний печени, таких как, например, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), неалкогольная жировая болезнь печени и первичный билиарный цирроз; фиброза, например, фиброза почек; хронического заболевания почек; диабетической невропатии, фокально-сегментарного гломерулосклероза, почечной недостаточности; метаболических заболеваний, остеопороза, атеросклероза, воспалительных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, рака, боли, системного склероза, спастичности при рассеянном склерозе, глаукомы и никотиновой зависимости.

63. Конъюгат антитела, содержащий выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-47, в котором антитело или его

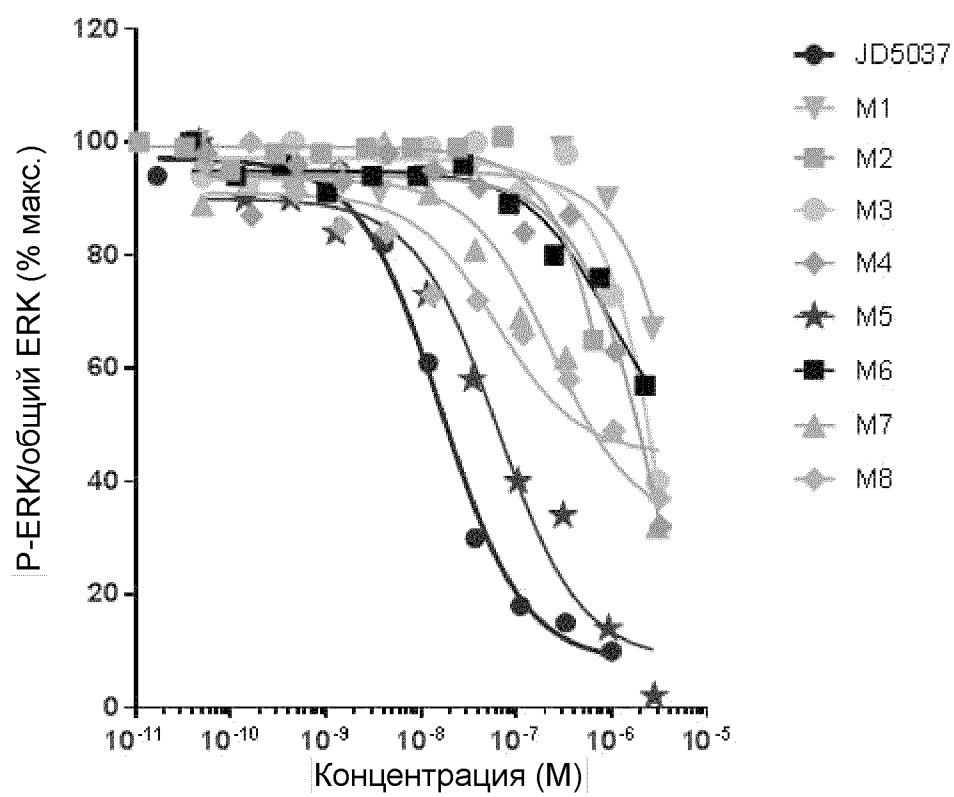
антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с агентом, выбранным из группы, состоящей из терапевтического агента, цитотоксического агента, молекулы иммуноадгезии и визуализирующего агента.

По доверенности



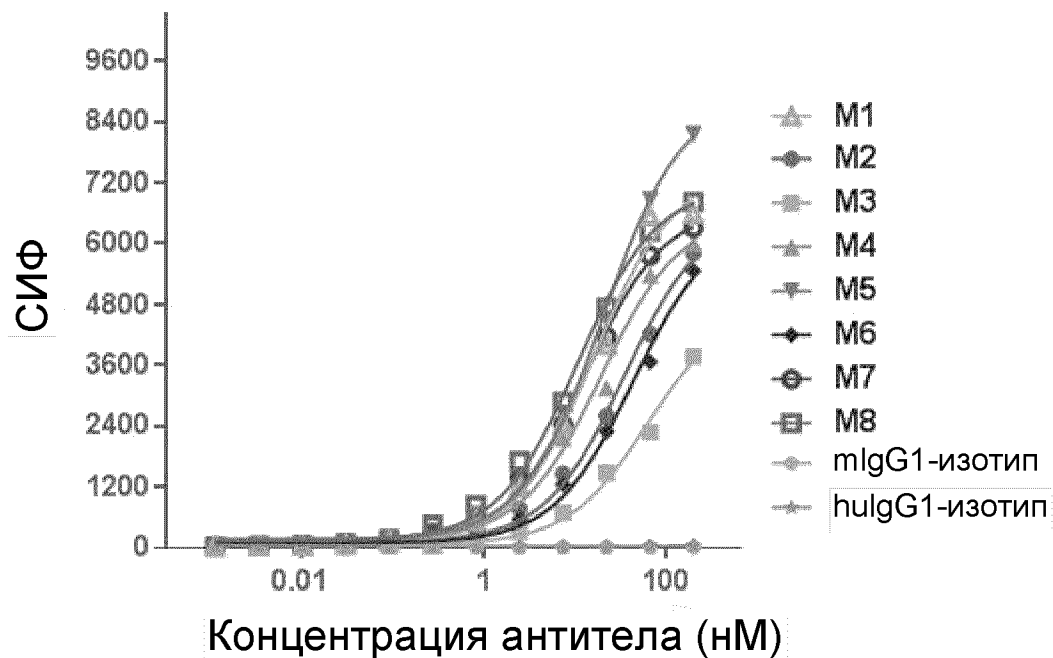
ФИГ. 1

Анализ p-ERK
Ат + 30 нМ CP-55940



ФИГ. 2

Связывание антител против СВ1 на
клетках CHO, экспрессирующих СВ1 человека



ФИГ. 3А

Связывание антител против СВ1 на
клетках CHO, экспрессирующих СВ1 мыши

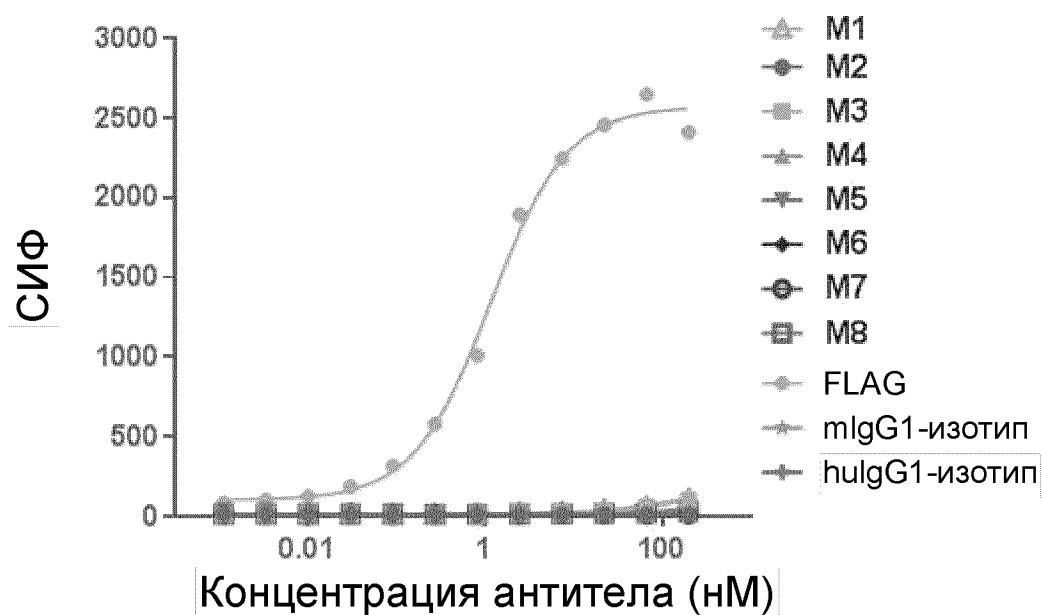
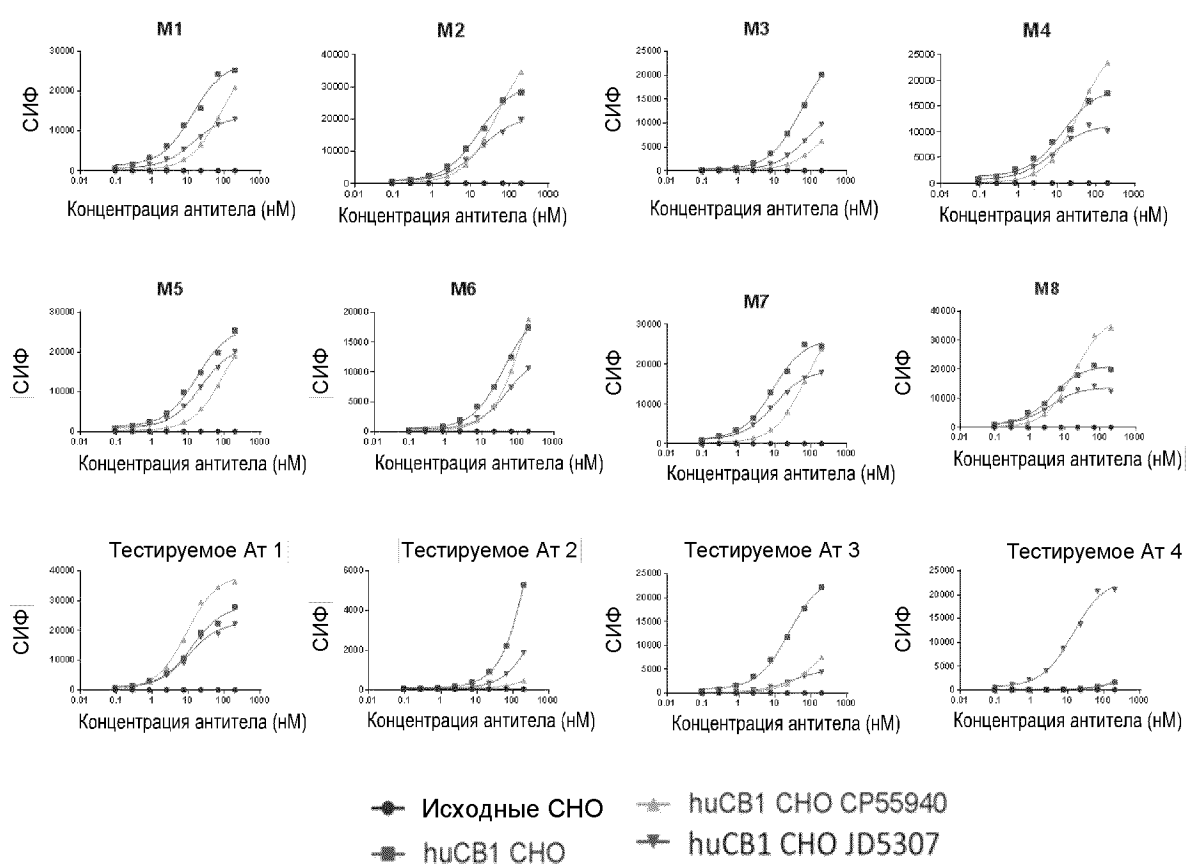


FIG.3B



ФИГ. 4

Гибридные тяжелые цепи

		FR1										CDR1										FR2										CDR2									
		11020304057																																							
M1	(1)	QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFTHALHWVKQSQARSL										EWIGISTYYGDI																													
M2	(1)	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYTFTDYNMHWVKLG--KS										LEWIGYFYPDDGG																													
M3	(1)	QVQLQQSGPELVLRPGVSVKISCKGSGYEFTHALHWVKQSHAETL										EWIGLITYYGDI																													
M4	(1)	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFNYIWMNWVKORPGQ										GLEWIGQIYPGDGI																													
M5	(1)	QVHLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFNYIWMNWVKORPGQ										GHEWIGQIYPGDGI																													
M6	(1)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNLHWVKHG--KS										LEWIGYIYPYDGI																													
M7	(1)	EVQLQQPGAELVRPGASVKISCKASSYTFTRYWMNWVKORPEEG										LEWIGMIDPYDSE																													
M8	(1)	QVQLQQPGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYWMHWVKORPGH										GLEWIGETYPSSGR																													
Консенсусная	(1)	OVQLQQSGAELVRPGASVKISCKASGYTFTDYWMHWVKORPG										XGLEWIGXIYPYDGI																													

		FR3										CDR3									
		58708090100114																			
M1	(58)	ATYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAFYYCARGGL										YGYGTNYRAMDYWG									
M2	(56)	SGYNQKFKGKATLTIDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARGYG										-----NSWGTYYWG									
M3	(58)	TNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSATYYCARGG										YYYGTDIRYFDVWG									
M4	(58)	INYNQKFKGKATLTSDKSSSTVYMLSSLTSEDSAVYFCRSK										-----GNPFATYG									
M5	(58)	TNYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCARGR										-----AAWFATYG									
M6	(56)	TGYKQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGY										-----NSWGATYG									
M7	(58)	THYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSTLTSEDSAVYFCARSQ										-PR---YYAMDYWG									
M8	(58)	ANYNGNEKFRKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS										---R---GNVLPYWG									
Консенсусная	(58)	TNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARG										XXXXXXXXXX XXWG									

		FR4										
		115123										
M1	(115)	QGTLVTVSS										SEQ ID NO: 18
M2	(108)	QGTLVTVSA										SEQ ID NO: 30
M3	(115)	AGTIVTVSS										SEQ ID NO: 42
M4	(109)	QGTLVTVSA										SEQ ID NO: 54
M5	(110)	QGTLVTVSA										SEQ ID NO: 66
M6	(108)	QGTLVTVSA										SEQ ID NO: 78
M7	(111)	QGTSVTVSS										SEQ ID NO: 90
M8	(109)	HGTPVTVSA										SEQ ID NO: 102
Консенсусная	(115)	QGTLVTVSA										SEQ ID NO: 329

ФИГ. 5А

Гибридные легкие цепи

		FR1	CDR1	FR2	CDR2		
	(1)	1	10	20	30	40	57
M1	(1)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCNASQNVGS-NVANYQQKPGQSPKALIYSASTRYS					
M2	(1)	EIVLTQSPPTTMAASPGEKITITCSASSRISSNLYWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLAS					
M3	(1)	DILLTQSPAILSVSPGERVSPFSCRASQSIGT-NIHWYQQRPNGSPRLLIKYASESIS					
M4	(1)	DIQMTQTSSLSASLGDSVTISCRASQGI RN-YLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS					
M5	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCOASENIAS-DLAWYQQKQKSPQLLVYDARNLAD					
M6	(1)	EIVLTQSPPTTMAASPGEKITITCSATSSISSNLYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLAS					
M7	(1)	DIQMSQSPSSLSASLGERVSLTCHASQEISG-FLSWLQLRPDGTIKRLIYAASSIDS					
M8	(1)	QIVLTQSPAIMASLGERVTMTCTAGSTVSSSYLHWYQQRPQGSSPKLWIYGTSNLAS					
Консенсусная	(1)	DIVLTQSPASLSASLGERVTITCRASQ X SS XILHWYQQKPG X SPKLLIY XSNLAS					

		FR3	CDR3	FR4		
	(58)	58	70	80	90	108
M1	(57)	GVPPDREFGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNYPFTFGSGTKLEIK				SEQ ID NO: 24
M2	(58)	GVPARFSGSGSGTYSYSLTIQTMEAEDEVATYYCQQGSSIPYTFGGGTKLEIK				SEQ ID NO: 36
M3	(57)	GIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVESEDIADYYCQQSITWPLTFGAGTKLEIK				SEQ ID NO: 42
M4	(57)	GVPPRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDLATYFCQQGNLTLPYTFGGGTKLEIK				SEQ ID NO: 60
M5	(57)	GVPPRFSGSGSGTHYSLNIHSLQSEDEVARYYCQHYYGTP-TFGAGTKLEIK				SEQ ID NO: 72
M6	(58)	GVPARFSGSGSGTYSYSLTIQTMEAEDEVATYYCQQGSSIPYTFGGGTKLEIK				SEQ ID NO: 84
M7	(57)	GVPKRFRGSGSWGSDYSLTISSLESEDFADYYCLOYSSYPYTFGGGTKLEIK				SEQ ID NO: 96
M8	(58)	GVPARFSGSGSGTYSYSLTISSMEAEADAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEIK				SEQ ID NO: 108
Консенсусная	(58)	GVPARFSGSGSGTDYSLTISSLESEDEVATYYCQQY X XPTFGGGTKLEIK				SEQ ID NO: 330

ФИГ. 5В

Гуманизированные тяжелые цепи

		FR1	CDR1	FR2	CDR2		
	(1)	1	10	20	30	40	57
M7-H1	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H2	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H3	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H4	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H5	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H6	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H7	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H8	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H9	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H10	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H11	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H12	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H13	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H14	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H15	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M7-H16	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M5-H1	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
M5-H2	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					
Консенсусная	(1)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASSYTFTRYWMNWKQAPGGGLEWIGMIDPYDSE					

		FR3	CDR3	FR4			
	(58)	58	70	80	90	100	114
M7-H1	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 114
M7-H2	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 126
M7-H3	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 138
M7-H4	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 150
M7-H5	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 162
M7-H6	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 174
M7-H7	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 186
M7-H8	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 198
M7-H9	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 210
M7-H10	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 222
M7-H11	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 234
M7-H12	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 246
M7-H13	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 258
M7-H14	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 270
M7-H15	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 282
M7-H16	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 294
M5-H1	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 306
M5-H2	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 318
Консенсусная	(58)	THYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSQPRYYANDYWGQGT					SEQ ID NO: 331

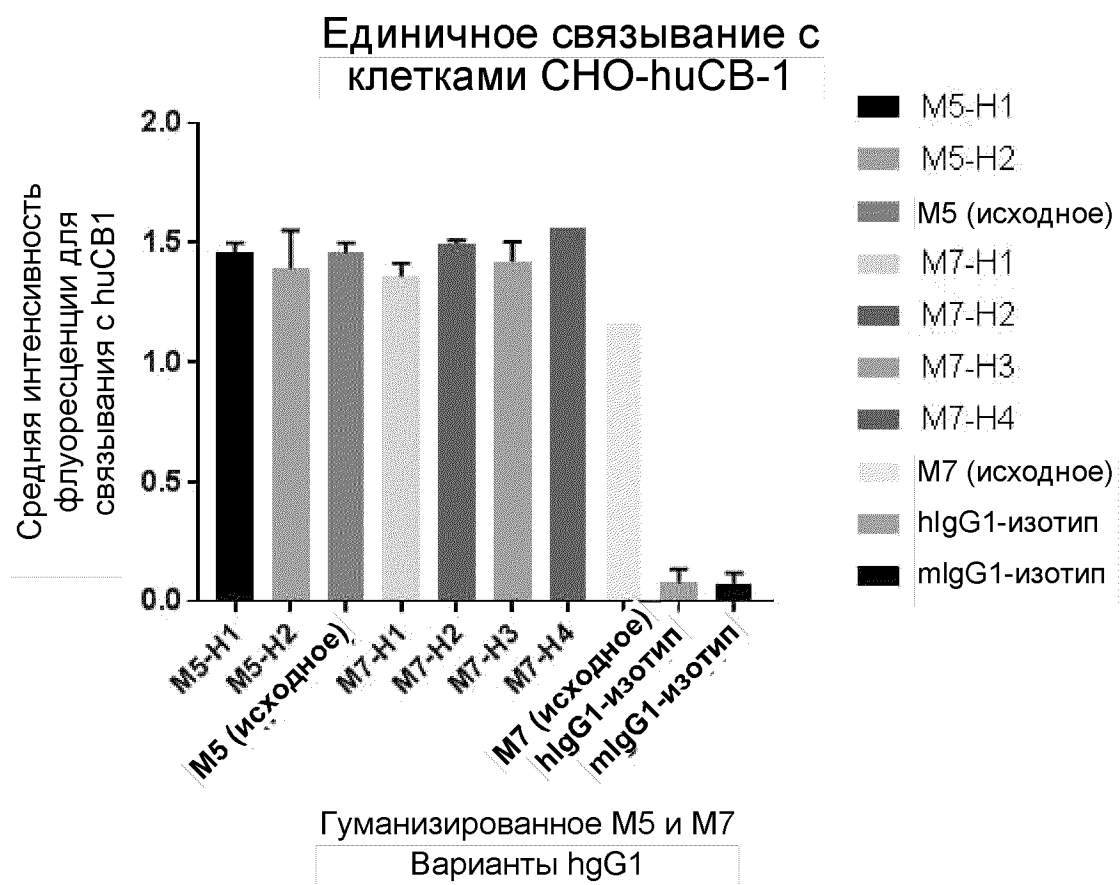
ФИГ. 6А

Гуманизированные легкие цепи

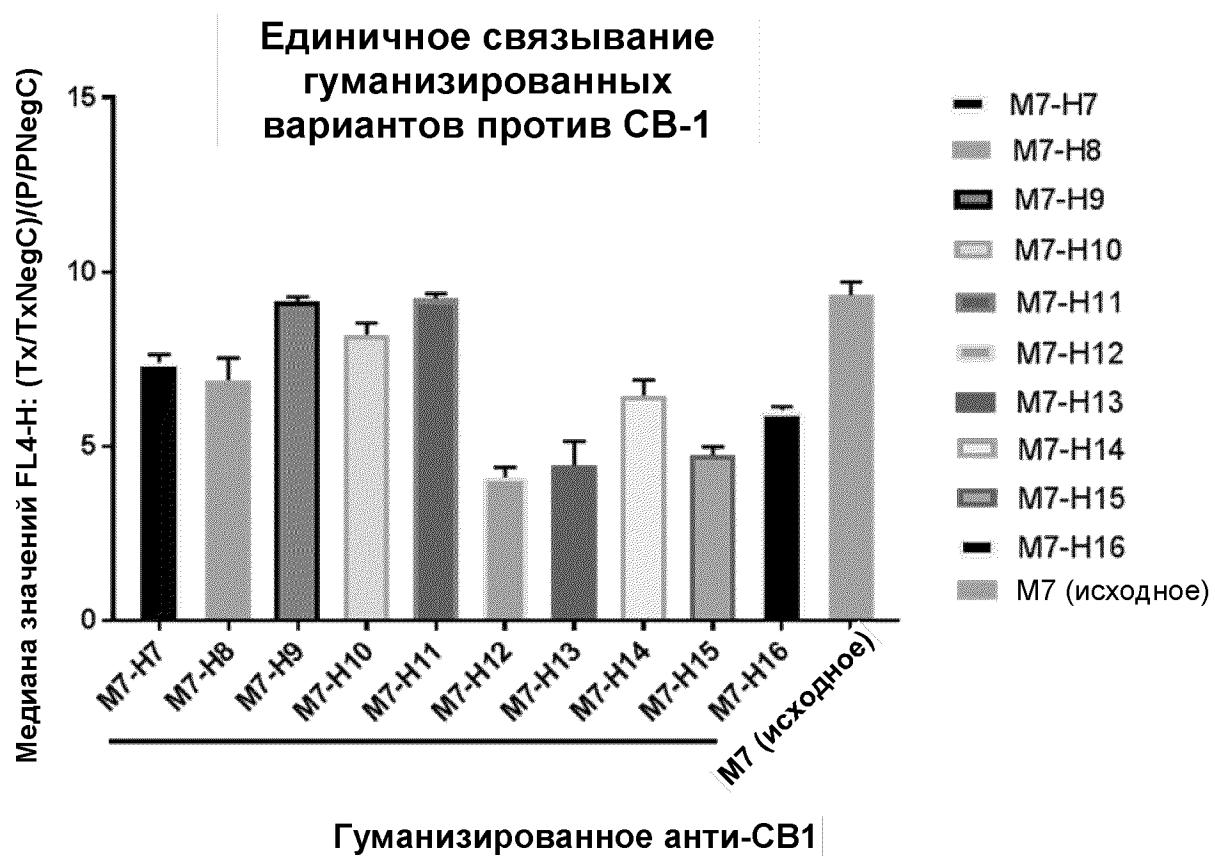
		FR1	CDR1	FR2	CDR2
	(1)	11020304057			
M7-H1	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKTIKRLIYAASS	
M7-H2	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	
M7-H3	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKTIKRLIYAASS	
M7-H4	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	
M7-H5	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLRPGGTIKRLIYAASS	
M7-H6	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLAWFQQMPGKAPKSLIYAASS	
M7-H7	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKTIKRLIYAASS	
M7-H8	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKTIKRLIYAASS	
M7-H9	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKTIKRLIYAASS	
M7-H10	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKTIKRLIYAASS	
M7-H11	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKTIKRLIYAASS	
M7-H12	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	
M7-H13	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	
M7-H14	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	
M7-H15	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	
M7-H16	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	----	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	
M5-H1	(1)	DIQLTQSPSSLSVSGDRATITCRASQSS	SSFRYS	SLHWYQQKPGKAPKLLIKYASN	
M5-H2	(1)	DIQLTQSPSSLSVSGDRATITCRASQSS	SSFRYS	SLHWYQQKPGKAPKLLIKYASN	
Консенсусная	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTLTCSRASQEIS	XXXX	GFLSWLQLKPGKAIRRLIYAASS	

		FR3	CDR3	FR4
	(58)	58708090100112		
M7-H1	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 120
M7-H2	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKVEIK		SEQ ID NO: 132
M7-H3	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 144
M7-H4	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKVEIK		SEQ ID NO: 156
M7-H5	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 168
M7-H6	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 180
M7-H7	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 192
M7-H8	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 204
M7-H9	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 216
M7-H10	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 228
M7-H11	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 240
M7-H12	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 252
M7-H13	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 264
M7-H14	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 276
M7-H15	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 288
M7-H16	(54)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 300
M5-H1	(58)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 312
M5-H2	(58)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 324
Консенсусная	(58)	LD SGVPSRFSGGWSGTDYTLTISSLPQEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK		SEQ ID NO: 332

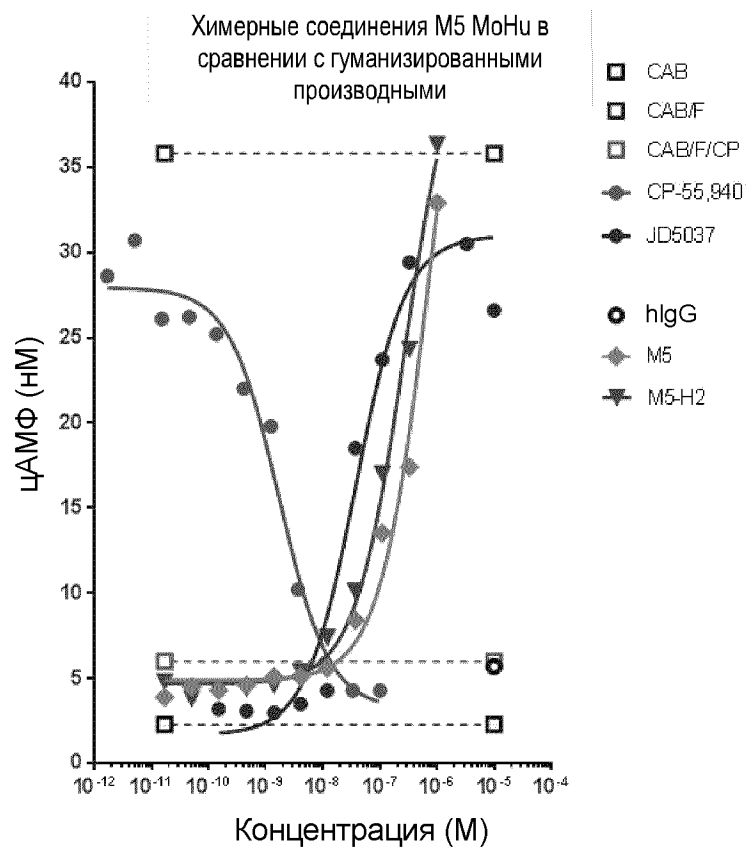
ФИГ. 6В



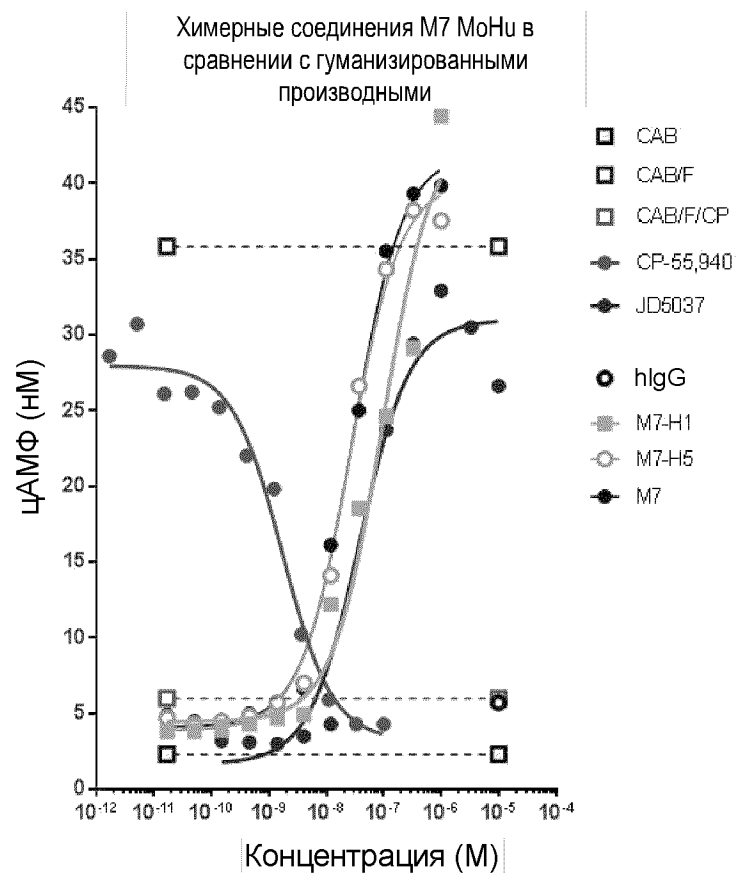
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

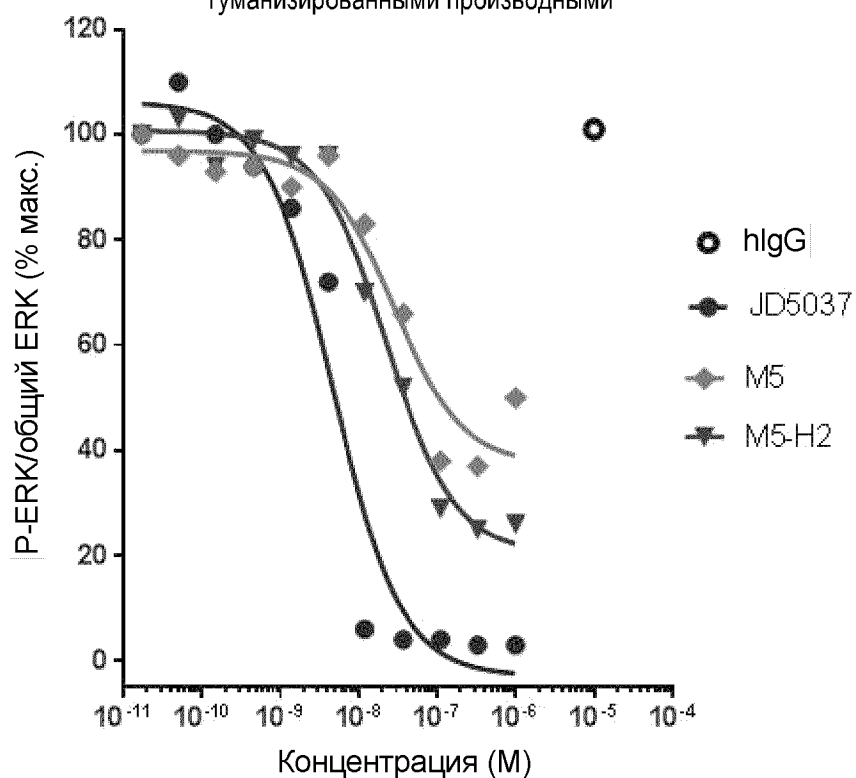


ФИГ. 8А



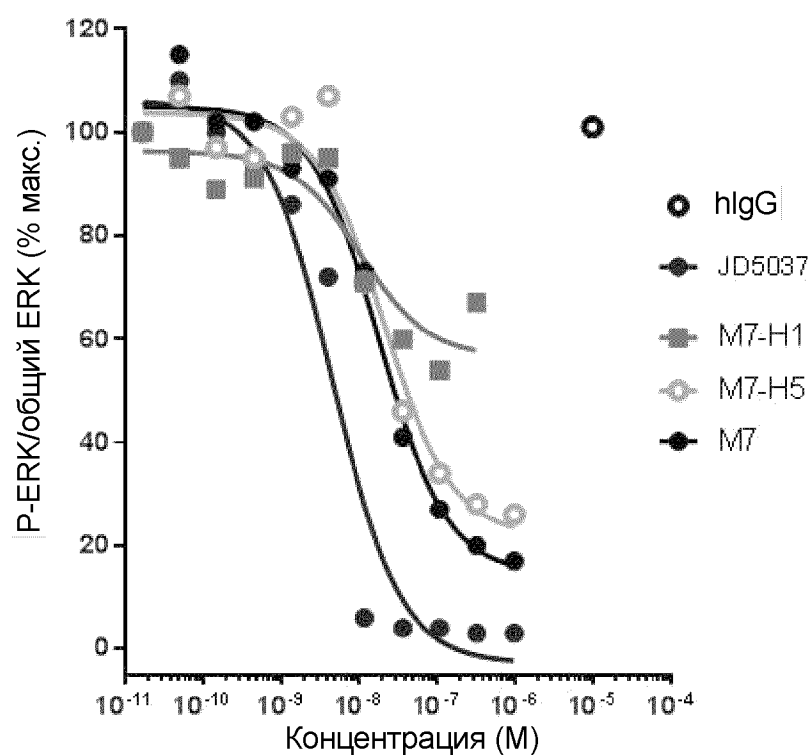
ФИГ. 8В

Химерные соединения M5 МоНу в сравнении с
гуманизированными производными

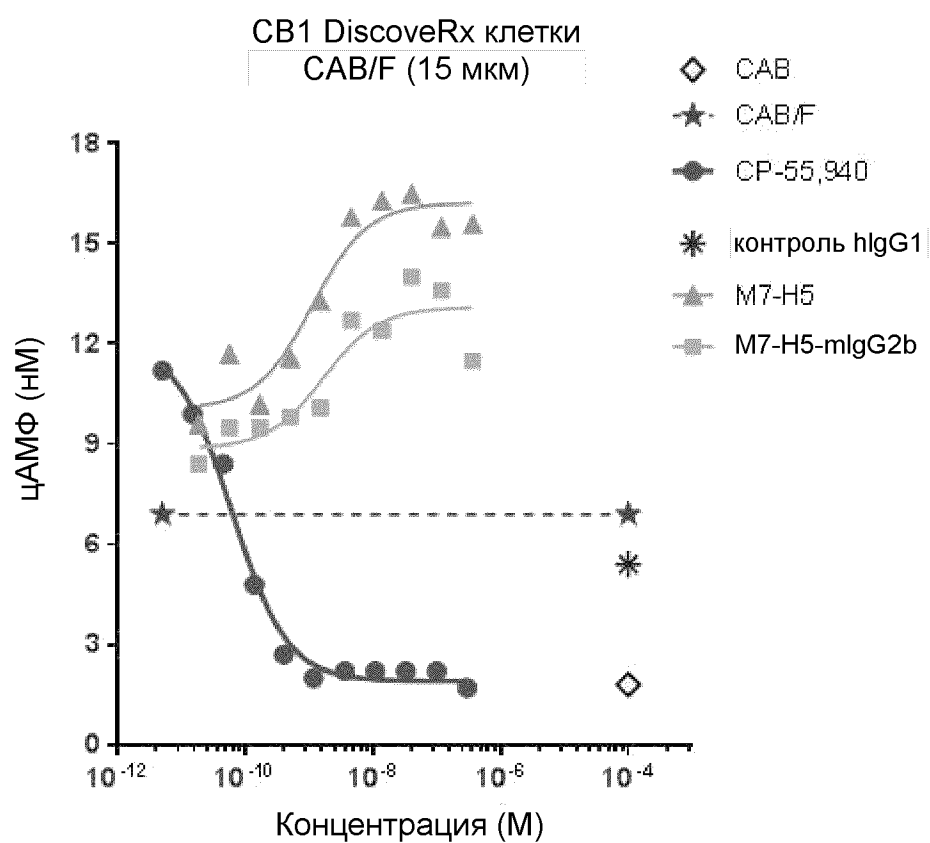


ФИГ. 9А

Химерные соединения M7 МоНу в сравнении с
гуманизированными производными



ФИГ. 9В



ФИГ. 10