

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040375**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.25

(21) Номер заявки
201990253

(22) Дата подачи заявки
2016.07.11

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ S100A9 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/CA2016/050810**

(87) **WO 2017/008153 2017.01.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТЕ ЛАВАЛЬ (CA)

(72) Изобретатель:
**Тессье Филипп, Тардиф Мелани,
Сулеа Траян (CA)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) CESARO, A. et al. An inflammation loop orchestrated by S100A9 and calprotectin is critical for development of arthritis. PLoS ONE. September 2012 (09-2012), vol. 7, no. 9, e45478, ISSN 1932-6203. *see the entire document*

MOLES, A. et al. A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse. Journal of Hepatology. April 2014 (04-2014), vol. 60, no. 4, pp. 782-791, ISSN 0168-8278. *see the entire document*

(57) Предлагается ингибитор Toll-подобного рецептора 2 (TLR2), специфично блокирующий взаимодействие между белком S100A9 и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2), а конкретнее - гуманизированное антитело против белка S100A9 для подавления и лечения воспалительных состояний у людей. В частности, это гуманизированное антитело специфично блокирует взаимодействие между белком S100A9 и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2).

B1

040375

040375

B1

Область техники, к которой относится данное изобретение

Данное изобретение относится к ингибитору Toll-подобного рецептора 2 (TLR2), который специфично блокирует взаимодействие между S100A9 и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2).

Уровень техники

Артрит - это хроническое расстройство, характеризующееся воспалением периферических суставов. Степень тяжести заболевания широко варьирует: у многих больных чередуются периоды обострения и ремиссии, но в целом состояние постепенно ухудшается в силу прогрессирующего разрушения и деформации суставов. Из-за стойкого воспаления возникают симптомы и повреждение тканей, ведущие к потере хрящевых структур и эрозии костного вещества, а также подвывихам суставов. В результате индивид очень страдает от болей, что существенно ухудшает его качество жизни. Артрит диагностируется обычно по данным определения ревматоидных факторов в крови и рентгеновским снимкам периферических суставов.

Первичное лечение артрита включает препараты "первой линии" для контроля боли и воспаления, а именно нестероидные противовоспалительные средства (NSAID), например аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат и др. Вторая линия предполагает использование кортикостероидных препаратов, медленно действующих противоревматических препаратов (SAARD) или средств, модифицирующих течение заболевания (DM), например пенициллинамина, циклофосамида, солей золота, азотиоприна, левамизола, метотрексата и др.

Все упомянутые выше лекарственные средства обладают различными токсическими побочными эффектами и большинство из них цитотоксичны. Преимущества этих лекарств ограничены, а действие, как правило, непродолжительно. Из-за их побочных эффектов, например эрозии желудка и негативного воздействия на функции почек и печени, длительное применение противопоказано. Кроме того, обычно назначаемые препараты такого рода недешевы и отличаются низким отношением риск/польза.

Таким образом, существует непреходящая потребность в иной терапии, способах, композициях и веществах для лечения воспалительных процессов - таких, которые были бы недороги, безопасны, эффективны и позволяли бы обойтись без обычно используемых в настоящее время продуктов, обладающих нежелательными побочными эффектами, в частности при длительном ежедневном применении.

Краткое изложение сущности изобретения

Данным изобретением предлагается ингибитор Toll-подобного рецептора 2 (TLR2), который специфично блокирует взаимодействие между S100A9 и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2).

В одном из воплощений данного изобретения указанный ингибитор является антителом, специфично связывающимся с эпитопом белка S100A9.

В другом воплощении данного изобретения указанный ингибитор адаптирован для ингибирования связывания указанного белка S100A9 с TLR2.

В еще одном воплощении данного изобретения указанный ингибитор TLR2 является антителом против белка S100A9.

В дополнительном воплощении данного изобретения антитело против белка S100A9 является мышиным.

В еще одном воплощении данного изобретения антитело против белка S100A9 является гуманизированным.

В другом воплощении данного изобретения антитело против белка S100A9 содержит связывающий эпитоп фрагмент, выбираемый из группы, состоящей из Fv, F(ab') или F(ab')₂.

В одном из воплощений данного изобретения указанное антитело содержит участок связывания эпитопа, связывающий C-концевую или шарнирную область белка S100A9.

В другом воплощении данного изобретения указанное антитело содержит участок связывания эпитопа, связывающий последние 10 аминокислотных остатков C-концевой области белка S100A9.

В еще одном воплощении данного изобретения указанное антитело представлено связывающим эпитоп одноцепочечным антителом.

В другом воплощении данного изобретения указанное антитело узнает определенный эпитоп молекулы белка S100A9, обозначаемый LGxxTx и представленный последовательностью SEQ ID NO: 70.

В другом воплощении данного изобретения такой эпитоп белка S100A9 обозначен LGExTP и представлен последовательностью SEQ ID NO: 71.

В другом воплощении данного изобретения такой эпитоп белка S100A9 обозначен PGLGExTP и представлен последовательностью SEQ ID NO: 72.

В другом воплощении данного изобретения такой эпитоп белка S100A9 обозначен PGLGEGTP и представлен последовательностью SEQ ID NO: 67.

В одном из воплощений данного изобретения антитело против белка S100A9 содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 21, 22, 23, 25 и 41.

В одном из воплощений данного изобретения антитело содержит последовательность, выбираемую из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 2 и 25.

В другом воплощении данного изобретения антитело содержит последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47 и 48.

Данным изобретением также предлагается антитело содержащее цепь, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 21, 22, 23, 25 и 41.

В одном из воплощений данного изобретения антитело против белка S100A9 содержит цепь, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 25.

Данным изобретением также предлагается антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и/или антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

Данным изобретением также предлагается композиция, содержащая описанные в настоящем документе ингибитор или антитело и физиологически или фармацевтически приемлемый эксципиент.

В другом воплощении данного изобретения указанная композиция предназначена для лечения воспалительного состояния.

Данным изобретением также предлагается применение описанных в настоящем документе ингибитора, антитела или композиции для лечения воспалительного состояния.

Данным изобретением также предлагается применение описанных в настоящем документе ингибитора, антитела или композиции при производстве медикамента для лечения воспалительного состояния.

Данным изобретением также предлагается способ для лечения воспалительного состояния, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду эффективного количества описанных в настоящем документе ингибитора, антитела или композиции.

В одном из воплощений данного изобретения воспалительное состояние по данному изобретению выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита, астмы, подагры, диабета типа I, болезни Крона, системной красной волчанки, рассеянного склероза, воспалительных заболеваний кишечника (IBD), язвенного колита, хронических воспалительных состояний, аутовоспалительных синдромов, псориаза и метастазирующего рака.

В другом воплощении данного изобретения воспалительное состояние по данному изобретению является хроническим воспалительным заболеванием. Хронические воспалительные заболевания по данному изобретению включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) пиогенный артрит, гангренозную пиодермию, угревую сыпь, болезнь Стилла взрослых и системный ювенильный идиопатический артрит.

В еще одном воплощении данного изобретения воспалительное состояние по данному изобретению является ревматоидным артритом.

В еще одном воплощении данного изобретения предлагаемое антитело вводят млекопитающему.

В другом воплощении данного изобретения подлежащее указанному лечению млекопитающее является человеком.

В дополнительном воплощении данного изобретения предлагаемое антитело вводят в организм подкожно, внутримышечно, внутрисуставно или внутривенно.

Термин "ингибирование"/"подавление" в настоящем документе означает ослабление реакции, например воспалительной реакции или воспалительного состояния. Ингибирование/подавление по данному изобретению - это предпочтительно лечение.

Термин "воспалительное состояние" в настоящем документе подразумевает (не ограничиваясь перечисленным здесь) ревматоидный артрит, астму, подагру, диабет типа I, болезнь Крона, системную красную волчанку, рассеянный склероз, воспалительные заболевания кишечника (IBD), язвенный колит, хронические воспалительные состояния, аутовоспалительные заболевания и псориаз. Термин "воспалительное состояние" в настоящем документе также относится к хроническим воспалительным заболеваниям. Понятие "хроническое воспалительное заболевание" включает (не ограничиваясь перечисленным здесь) пиогенный артрит, гангренозную пиодермию, угревую сыпь, болезнь Стилла взрослых и системный ювенильный идиопатический артрит.

Термин "лечение" в настоящем документе включает системное применение с целью ослабления, облегчения или регуляции воспалительного процесса, например воспалительного ревматического или ревматоидного заболевания, состояния или явления. Этот термин также включает вмешательство с целью ослабления, облегчения или регуляции осложнений, последствий или симптомов воспалительного процесса, например дегенеративных изменений (например, клеток, эпителия или иных тканей) или, в частности, отека, эксудации или эффузии или боли. В данном контексте термин "лечение" также следует понимать как включающий применение с целью обращения, ограничения или регуляции прогрессирования какого-либо определенного заболевания, процесса, состояния, явления и др., включая применение с целью модифицирования течения болезни. Если какое-либо из упомянутых здесь заболеваний, процессов, состояний или явлений связано с болью, то термин "лечение" предпочтительно включает ослабление, облегчение или регуляцию (в том числе временное или постоянное устранение) по меньшей мере одного из явлений или симптомов помимо боли, например отека, эффузии, эксудации, ригидности, утраты подвижности сустава или дегенеративных изменений, более предпочтительно всех симптомов и наиболее предпочтительно полная ликвидация клинической картины соответствующего заболевания, раздражения или проявления.

Краткое описание иллюстраций

Фиг. 1 иллюстрирует специфичность моноклональных антител 6B4 против мышинового и человеческого белков S100A9. Проводили стандартный иммуноферментный анализ (ELISA) на 96-луночных планшетах для высокого связывания рекомбинантных мышинных и человеческих белков S100A (1-1000 нг в 100 мкл) и очищенного человеческого кальпротектина.

Фиг. 2 иллюстрирует специфичность моноклональных антител 6B4 против человеческих белков S100A8, S100A9 и S100A12 proteins. Рекомбинантные белки S100A8, S100A9, S100A12, ms100a8 (мышинный S100A8), ms100a9 (мышинный S100A9), очищенный человеческий кальпротектин и неочищенный экстракт наносили на SDS-PAGE; 15%, затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану и выявляли методом вестерн-блоттинга, используя моноклональные антитела 6B4.

Фиг. 3 изображает молекулярную модель переменных доменов мышинового антитела 6B4 и его гуманизованного варианта 1. Замененные аминокислотные остатки каркасных участков изображены шариками на палочках, как в шаро-стержневых моделях. Отмечены аминокислотные остатки из мышинных последовательностей, сохраненные в гуманизованном антителе (также изображены шариками на палочках). Отмечены петли CDR, обозначенные H1, H2, H3 в тяжелой цепи и L1, L2, L3 в легкой цепи.

Фиг. 4 изображает наложение моделей переменных доменов мышинового и гуманизованного антител 6B4, выявляющее участки, подлежащие обратным мутациям. На вставках аминокислотные остатки каркасных участков человеческих последовательностей, подвергнутые обратным мутациям в сторону мышинных последовательностей, выделены как в стержневых моделях.

Фиг. 5 иллюстрирует выравнивание последовательностей переменных доменов легких цепей мышинового и гуманизованного антител 6B4.

Фиг. 6 иллюстрирует выравнивание последовательностей переменных доменов тяжелых цепей мышинового и гуманизованного антител 6B4.

Фиг. 7 демонстрирует, что антитела 6B4 узнают C-концевой пептид белка S100A9. Рекомбинантные белки S100A8 и S100A9 (1 мкг), раствор PBS1x, N-концевой (N), шарнирный (H) и C-концевой (C) пептиды (10 мкг и 50 мкг) наносили на PVDF мембрану и проводили анализ методом дот-блоттинга, используя моноклональные антитела 6B4.

Фиг. 8 демонстрирует, что антитела 6B4 узнают последние 10 аминокислотных остатков C-концевого участка белка S100A9 (пептид C7). По 2,5 мкг рекомбинантного белка S100A9, C-концевого участка и пептидов C₁-C₇, рекомбинантного мышинового белка S100A9 и C-концевого участка мышинового S100A9 наносили на PVDF мембрану и проводили анализ методом дот-блоттинга, используя моноклональные антитела 6B4.

Фиг. 9 демонстрирует, что антитела 6B4 и поликлональные антитела против белка S100A9 узнают в основном последние 10 аминокислотных остатков его C-концевого участка (пептид C7). В лунки 96-луночного планшета для высокого связывания вносили пептиды белка S100A9 в возрастающих концентрациях. Неспецифическое связывание блокировали раствором [PBS/0,1% Tween/2% BSA], после чего в лунки добавляли раствор, содержащий (A) 6B4 (2 мкг/мл) или (B) поликлональные антитела a-A9 (1 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты тщательно промывали и вносили в лунки козы антитела против мышинового иммуноглобулина, конъюгированные с пероксидазой хрена; инкубировали планшеты в течение 1 ч при комнатной температуре. Прибавляли субстрат пероксидазы тетраметилбензидинсульфонат (TMBS) и останавливали реакцию серной кислотой (H₂SO₄). Измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм. Другие моноклональные антитела против S100A9 также связывались с пептидом C7, как показано на фиг. 10.

Фиг. 10 демонстрирует, что все моноклональные антитела против белка S100A9 связываются с последними 10 аминокислотными остатками его C-концевого участка (пептид C7). В лунки 96-луночного планшета для высокого связывания вносили пептиды белка S100A9 в возрастающих концентрациях. Неспецифическое связывание блокировали раствором [PBS/0,1% Tween/2% BSA], после чего в лунки добавляли раствор, содержащий 1 мкг/мл 6B4, 2H11, 4E8, 4B6, 2B4 или 1F8 (в качестве отрицательного контроля использовали антитела против S100A8), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты тщательно промывали и вносили в лунки козы антитела против мышинового иммуноглобулина, конъюгированные с пероксидазой хрена; инкубировали планшеты в течение 1 ч при комнатной температуре. Прибавляли субстрат пероксидазы тетраметилбензидинсульфонат (TMBS) и останавливали реакцию серной кислотой (H₂SO₄). Измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм.

Фиг. 11 демонстрирует, что непрерывный эпитоп, узнаваемый антителами 6B4, - это аминокислотная последовательность PGLGEGTP (C7a). В лунки 96-луночного планшета для высокого связывания вносили пептиды белка S100A9 в возрастающих концентрациях. Неспецифическое связывание блокировали раствором [PBS/0,1% Tween/2% BSA], после чего в лунки добавляли раствор, содержащий 1 мкг/мл 6B4 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля в некоторые лунки вносили только PBS (2e Ab). Планшеты тщательно промывали и вносили в лунки козы антитела против мышинового иммуноглобулина, конъюгированные с пероксидазой хрена; инкубировали планшеты в течение 1 ч при комнатной температуре. Прибавляли сTMBS и останавливали реакцию H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм.

Фиг. 12 демонстрирует, что для связывания антител 6B4 с эпитопом, расположенным в С-концевом участке белка S100A9, критически важны аминокислотные остатки L109, G110, T113, а также - в меньшей степени - E111 и P114. В лунки 96-луночного планшета для высокого связывания вносили пептиды белка S100A9 в возрастающих концентрациях. Неспецифическое связывание блокировали раствором [PBS/0,1% Tween/2% BSA], после чего в лунки добавляли раствор, содержащий 6B4 (1 мкг/мл), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты тщательно промывали и вносили в лунки козьи антитела против мышиноного иммуноглобулина, конъюгированные с пероксидазой хрена; инкубировали планшеты в течение 1 ч при комнатной температуре. Прибавляли ТМБС для выявления реакции и останавливали реакцию H_2SO_4 . Измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм.

Фиг. 13 демонстрирует, что гуманизированные антитела 6B4 узнают С-концевой пептид белка S100A9. Рекомбинантный человеческий белок S100A9, мышинный белок S100A9 (Mu14) (по 1 мкг), PBS1x и С-концевой пептид S100A9 (2 мкг) наносили на PVDF мембрану и проводили анализ методом дот-блоттинга, используя гуманизированные антитела 6B4 Hh+Lh или Hc+Lh.

Фиг. 14 демонстрирует, что белок S100A9 является лигандом Toll-подобного рецептора 2 (TLR2). Клетки THP(Blue), которые содержат репортерную конструкцию, экспрессирующую секретрируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), регулируемые транскрипционными факторами NF- κ B и AP-1, инкубировали с нейтрализующими антителами против TLR2 (5 мкг/мл), антителами, подходящими по изотипу (5 мкг/мл), или с PBS1x в течение 1 ч при температуре 37°C, после чего активировали белком S100A9 в указанной концентрации в течение 24 ч при температуре 37°C. После этого клетки центрифугировали, собирали супернатанты и инкубировали их с колориметрической репортерной системой Quanti-Blue по инструкциям производителя. Измеряли оптическую плотность на длине волны 650 нм. Результаты представлены как среднее +/- стандартная ошибка среднего (SEM) по двум одинаковым пробам в одном репрезентативном опыте (из трех независимых опытов).

Фиг. 15 демонстрирует, что блокирующие антитела против TLR2 подавляют индуцируемую белком S100A9 активацию NF- κ B в клетках THP(Blue). Клетки THP(Blue), которые содержат репортерную конструкцию, экспрессирующую ген секретрируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), по контролем NF- κ B и AP-1, инкубировали с нейтрализующими антителами против TLR2 (5 мкг/мл), антителами, подходящими по изотипу (5 мкг/мл) или с PBS1x в течение 1 ч при температуре 37°C, после чего активировали белком S100A9 в указанной концентрации в течение 24 ч при температуре 37°C. После этого клетки центрифугировали, собирали супернатанты и инкубировали их с колориметрической репортерной системой Quanti-Blue по инструкциям производителя. Измеряли оптическую плотность на длине волны 650 нм. Результаты представлены как среднее +/- стандартная ошибка среднего (SEM) по двум одинаковым пробам в одном репрезентативном опыте (из трех независимых опытов).

Фиг. 16 демонстрирует, что блокирующие кроличьи моноклональные антитела распознают шарнирный или С-концевой участок рекомбинантного S100A9. В лунки 96-луночного планшета вносили по 50 нг PBS1x, рекомбинантного белка S100A9, его N-концевого, шарнирного и С-концевого пептидов. Добавляли по 100 мкл супернатантов клеточных культур, содержащих блокирующие кроличьи антитела против белка S100A9 (11 клонов). Связывание моноклональных антител выявляли с помощью козьих антител против кроличьего IgG, меченных пероксидазой хрена. Моноклональные 1B5 и 7A8 связывались с С-концевым участком белка S100A9. Моноклональные антитела 6C1 связывались с шарнирным участком.

Фиг. 17 демонстрирует, что моноклональные антитела 1B5 и 7A8 связываются с 10 последними аминокислотными остатками С-концевого участка белка S100A9 (пептид С7). В лунки 96-луночного планшета вносили по 50 нг PBS1x, рекомбинантного белка S100A9, его С-концевого пептида и пептидов С₁-С₇. Добавляли по 100 мкл супернатантов клеточных культур, содержащих блокирующие кроличьи антитела против белка S100A9 (11 клонов). Связывание моноклональных антител выявляли с помощью козьих антител против кроличьего IgG, меченных пероксидазой хрена. Оба указанных моноклональных антитела связывались с пептидом С7.

Подробное описание изобретения

Настоящим предлагается ингибитор Toll-подобного рецептора 2 (TLR2), который специфично блокирует взаимодействие между S1009A и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2).

В одном из аспектов данного изобретения предлагается антитело, специфично блокирующее взаимодействие между S1009A и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2).

В другом аспекте данного изобретения предлагается антитело, специфично связывающееся с эпитопом белка S100A9, участвующем во взаимодействии с Toll-подобным рецептором 2 (TLR2).

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается антитело, адаптированное к ингибированию связывания белка S1009A с TLR2.

Toll-подобный рецептор 2 (TLR2), являющийся членом семейства Toll-подобных рецепторов, играет существенную роль в иммунной системе. TLR2 представляет собой мембранный белок, экспрессирующийся на поверхности определенных клеток и распознающий чужеродные вещества. Действие TLR2 приводит к активации транскрипционных факторов NF- κ B и AP-1, что дает вклад в секрецию цитокинов,

например IL-1, IL-6 и TNF, связанную с такими аутоиммунными заболеваниями, как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и болезнь Крона.

Описанные в настоящем документе вещества, обладающие терапевтическим действием, включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) антитела (в том числе их фрагменты, аналоги и производные), связывающиеся с белком S100A9 (в том числе с его фрагментами, аналогами и производными и антиидиотипическими антителами). В частности, указанные антитела специфично блокируют взаимодействие между белком S1009A и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2). Говоря конкретнее, эти антитела специфично связываются с эпитопом белка S100A9, участвующим во взаимодействии между белком S1009A и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2), причем указанные антитела адаптированы к ингибированию связывания белка S1009A с Toll-подобным рецептором 2 (TLR2).

В частности, антитела по данному изобретению являются антителами против белка S1009A.

В другом воплощении данного изобретения взаимодействие указанных антител с белком S1009A зависит от присутствия ионов кальция (Ca^{+2}) и/или цинка (Zn^{+2}) в молекуле этого белка.

Белок S100A9, известный также под названиями кальгранулин В, и белок, связанный с миелоидной дифференцировкой клеток, 14 (MRP-14), относится к семейству белков S100, связывающих кальций и цинк. Эти белки интенсивно экспрессируются в клетках миелоидного направления дифференцировки; при воспалительных состояниях они обнаруживаются во внеклеточной среде. Молекулы белка S100A9 образуют гетеродимеры с молекулами другого белка семейства S100, обозначаемого S100A8. Но S100A9 может также существовать в мономерной форме, которая выполняет специфические функции. Человеческий белок S100A9 имеет молекулярную массу около 13 кДа и состоит из 114 аминокислотных остатков. Димер S100A8/A9 связывается с эндотелием кровеносных сосудов путем взаимодействия S100A9 с гепарансульфат-протеогликанами или комплекса S100A8/A9 с карбоксилированными N-гликанами, которые экспрессируются в эндотелиальных клетках только после воспалительной активации.

Как правило, белок S100A9 представлен гомодимерами, в которых мономеры связаны нековалентно. В присутствии кальция молекулы S100A8 и S100A9 нековалентно связываются, образуя гетеродимер S100A8/A9, называемый также кальпротектином, который предположительно участвует в клеточной регуляции концентрации кальция.

Белок S100A9 секретируется; он обнаруживается в сыворотке крови и в участках воспаления при аутоиммунных заболеваниях. Этот белок стимулирует миграцию нейтрофилов и моноцитов к участкам воспаления путем активации Mac-1, относящегося к $\beta 2$ -интегринам, в результате происходит адгезия указанных клеток с эндотелиальными клетками и их миграция по эндотелию (Anceriz et al, 2007, Biochemical and biophysical research communications, 354: 84-89). Белок S100A9 также индуцирует секрецию моноцитами человека и примированными нейтрофилами таких цитокинов, как TNF α , IL-1 β и IL-6 путем активации NF- κ B и инфламмасом (Simard et al., 2013, PloS one 8: e72138).

Белок S100A9 с высокой эффективностью индуцирует фагоцитоз и дегрануляцию, с умеренной эффективностью - образование активных форм кислорода (ROS) нейтрофилами и моноцитами (Simard et al., 2013, PloS one 8: e72138). Также белок S100A9 путем активации NF- κ B и инфламмасом вызывает в моноцитах секрецию таких цитокинов, как MIP-1 α , RANTES, MCP-1, IL-6 и TNF α (Simard et al., 2013, PloS one 8: e72138). Цитокины, в частности TNF α , в свою очередь, побуждают нейтрофилы к более интенсивному высвобождению S100A9, тем самым создается самоподдерживающийся цикл. Мыши S100a9^{-/-} резистентны в отношении артрита, индуцированного адьювантами, и системной красной волчанки; это объясняется отчасти ослабленной активацией Т-лимфоцитов CD8 (Loser et al, 2010, Nature medicine, 16: 713-717). Кроме того, на животных моделях моноклональные антитела против белка S100A9 предотвращают воспаление и разрушение суставов при артрите, вызванном коллагеном (Cesaro et al., 2012, PloS one 7: e45478); это связано с сокращением миграции лейкоцитов в места воспаления и секреции TNF α и IL-6. У мышей белок S100A9 вызывает высвобождение оксида азота (NO) дендритными клетками, происходящими из костного мозга, (Riva et al., 2012, Immunology, 137: 172-182), и макрофагами (Pouliot et al., 2008, J Immunol, 181: 3595-3601). Эти данные свидетельствуют, что белок S100A9 способствует воспалительной реакции, усиливая миграцию фагоцитов и вызывая секрецию провоспалительных цитокинов а также высвобождение ферментов, участвующих в разрушении тканей, и активных форм кислорода (ROS).

В настоящем документе описывается, что введение антител против белка S100A9 эффективно лечит воспалительные состояния, в частности ревматоидный артрит.

В другом аспекте данного изобретения предлагается композиция, содержащая описанные в настоящем документе антитела в смеси с физиологически или фармацевтически приемлемым эксципиентом.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения воспалительного состояния, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиции.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ иммунотерапии, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиции.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения нейродегенеративного заболевания, связанного с TLR-2, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиции.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ диагностирования или лечения связанного с Toll-подобным рецептором 2 (TLR-2) состояния клеток, ткани, органа или животного организма, включающий этап введения в указанные клетки, ткань, орган или животный организм нуждающегося в том индивида эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиции.

Гуманизированные антитела и антитела видов живых организмов, отличных от человека, модифицировали для того, чтобы их аминокислотная последовательность больше походила на таковую антител, образующихся в организме человека естественным путем. К гуманизации прибегают в тех случаях, когда процесс получения определенных антител включает их образование в иммунной системе живого организма, отличного от человека (например, мыши). Разработаны методы гуманизации антител, позволяющие получать белковые молекулы с минимальной иммуногенностью для человека, сохраняющие специфичность и аффинность исходных антител не человеческого происхождения. Аминокислотные последовательности полученных таким образом антител частично отличаются от таковых гомологичных антител, образующихся у человека естественным путем, поэтому они потенциально иммуногенны при введении людям.

Гуманизация сыграла основополагающую роль в успехе разработки антител в качестве терапевтических агентов. Мощными средствами создания антител для человека стали методы обнаружения человеческих антител *in vitro* с помощью таких прогрессивных технологий, как фаговый дисплей или иммунизация трансгенных мышей, несущих набор человеческих генов антител.

Говоря конкретнее, антитела по данному изобретению специфично связываются с эпитопом белка S100A9, тем самым блокируя его взаимодействие с Toll-подобным рецептором 2 (TLR2). В частности, антитела по данному изобретению ингибируют связывание белка S100 Toll-подобным рецептором 2 (TLR2). В частности, антитела по данному изобретению блокируют активацию Toll-подобного рецептора 2 (TLR2).

В одном из конкретных воплощений данного изобретения предлагаемые антитела содержат фрагмент, связывающий указанный эпитоп и выбираемый из следующих фрагментов: Fv, и/или F(ab'), и/или F(ab')₂. В частности, антитело по данному изобретению содержит одноцепочечное антитело, связывающее указанный эпитоп.

В одном из конкретных воплощений данного изобретения предлагаемые антитела содержат участок связывания, перекрывающегося с участком взаимодействия белка S100 с TLR2. В частности, антитело по данному изобретению узнает определенный эпитоп молекулы белка S100A9, обозначаемый LGxxTx (SEQ ID NO: 70). В частности это эпитоп, обозначаемый LGExTP (SEQ ID NO: 71), или PGLGExTP (SEQ ID NO: 72), или PGLGEGTP (SEQ ID NO: 67).

В одном из конкретных воплощений данного изобретения предлагаемые антитела содержат полипептидную цепь, выбираемую из последовательностей SEQ ID NO: 2, 21, 22, 23, 25 или 41, в частности из последовательностей SEQ ID NO: 2 или 25.

Описанные в настоящем документе антитела против белка S100 можно использовать в смеси с физиологически или фармацевтически пригодным носителем. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество антител по данному изобретению и физиологически или фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Физиологически или фармацевтически приемлемые носители по данному изобретению включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) солевой (физиологический) раствор, забуференный солевой (физиологический) раствор, декстрозу, воду, глицерин, этиловый спирт и их комбинации. Состав композиции по данному изобретению должен соответствовать способу ее введения в организм.

Описанные в настоящем документе антитела, действующие как ингибиторы или антагонисты белка S100, можно вводить в организм сами по себе или в сочетании с другими антителами, направленными против других сопряженных мишеней, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) другие полипептиды S100 или соответствующие им полинуклеотиды.

По настоящему описанию предлагается способ и композиция для лечения воспалительных состояний.

Сообщалось, что белки, связанные с миелоидным направлением дифференцировки клеток (MRP), играют роль в процессе миграции нейтрофилов к месту воспаления.

Антитела по данному изобретению можно применять для лечения, подавления или предотвращения заболеваний, расстройств или состояний, связанных с аномальной экспрессией и/или активностью описанных в настоящем документе полипептидов, включая (не ограничиваясь перечисленным здесь) какое-либо одно или более из описанных в настоящем документе воспалительных заболеваний, расстройств или состояний. Лечение и/или предотвращение воспалительных заболеваний, расстройств или состояний, связанных с экспрессией и/или активностью, направленной против белка S100, включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) ослабление симптомов, сопровождающих указанные заболевания, расстройства или состояния. Антитела против белка S100 предлагаются в составе фармацевтически прием-

лемых композиций, известных в данной области техники или описанных в настоящем документе.

Вкратце, перечень путей терапевтического использования описанных в настоящем документе антигенов включает связывание полипептидов S100 в организме местно, или системно, или путем непосредственной цитотоксичности антигенов, например опосредованной комплиментом (CDC) или эффекторными клетками (ADCC). Некоторые из этих подходов описываются подробнее ниже.

Антигена по данному изобретению предпочтительно используются в сочетании с другими моноклональными или химерными антигенами или же с лимфокинами. Антигена по данному изобретению вводят в организм сами по себе либо в комбинации с другими лечебными средствами (например, в сочетании с лучевой терапией, химиотерапией, гормональной терапией, иммунотерапией и противоопухолевыми агентами). Как правило, предпочтительно вводить продукты того же видового происхождения или реактивности (в случае антигенов), к которому принадлежит пациент. Таким образом, в одном из предпочтительных воплощений данного изобретения в терапевтических или профилактических целях человеку или животному вводят человеческие антигена, их фрагменты, аналоги, производные или соответствующие полинуклеотиды.

Для лечения расстройств, связанных с полипептидами S100 или соответствующими полинуклеотидами, включая их фрагменты, предпочтительно использовать высокоаффинные, и/или обладающие сильной ингибирующей активностью *in vivo*, и/или нейтрализующие антигена против описанных в настоящем документе полипептидов S100, или соответствующих полинуклеотидов, или их фрагментов или участков. Такие антигена, их фрагменты или участки предпочтительно обладают сродством к описанным в настоящем документе полипептидам S100 или к соответствующим полинуклеотидам, включая их фрагменты.

Подавление или снижение активности полипептидов S100 или соответствующих полинуклеотидов может приносить пользу при лечении заболеваний, расстройств и/или состояний иммунной системы путем подавления пролиферации, дифференцировки или мобилизации (хемотаксиса) клеток иммунной системы. Этиология этих заболеваний, расстройств и/или состояний иммунной системы может быть генетической, соматической (например, в случае раковых или некоторых аутоиммунных заболеваний, расстройств и/или состояний), приобретенной (например, в результате химиотерапии или воздействия токсинов) или инфекционной. Также антигена против S100 можно использовать в качестве маркеров или средств выявления определенных заболеваний или расстройств иммунной системы.

Сходным образом с помощью ингибиторов или антагонистов полипептидов S100 или соответствующих полинуклеотидов можно лечить, предотвращать и/или диагностировать аллергические реакции и состояния, например астму (в частности, аллергическую астму) или иные респираторные расстройства. Также ингибиторы или антагонисты полипептидов S100 или соответствующих полинуклеотидов можно использовать для лечения анафилактического шока, гиперчувствительности к антигенным агентам или для преодоления несовместимости по группе крови.

Ингибирование белка S100 можно достигнуть с помощью антигенов, связывающихся с ним или блокирующих доступ к этому белку или к его участкам связывания или к каким-либо сайтам активации, активизируемым S100. В частности, на многих клетках такой сайт связывания или активации является Toll-подобным рецептором 2 (TLR-2).

Антигена против белка (например, против S100A9) можно использовать для подавления хемотаксиса и активации макрофагов и их предшественников, а также нейтрофилов, базофилов, В-лимфоцитов и некоторых групп Т-лимфоцитов, например активированных и цитотоксических (CD8+)Т-лимфоцитов и НК-клеток (натуральных киллеров) при аутоиммунных и хронических воспалительных и инфекционных заболеваниях. Примеры аутоиммунных заболеваний, подлежащих такому лечению, включают ревматоидный артрит, рассеянный склероз и инсулинзависимый диабет. Также к заболеваниям, подлежащим такому лечению, относятся силикоз, саркоидоз, идиопатический фиброз легких, обусловленный нарушением мобилизации и активации одноядерных фагоцитов, идиопатический гиперэозинофильный синдром, обусловленный нарушением образования и миграции эозинофилов, эндотоксический шок, обусловленный нарушением миграции макрофагов и образования ими полипептидов-хемокинов, описанных в настоящем документе. Примеры хронических воспалительных процессов, подлежащих указанному лечению, стойко повышенный уровень кальпротектина и аутовоспалительный синдром. Антагонисты полипептидов S100 или соответствующих полинуклеотидов можно использовать для лечения атеросклероза, предотвращая инфильтрацию моноцитов в стенки артерий.

Антигена против белка S100 можно использовать также для лечения воспалительного процесса, предотвращая привлечение моноцитов в область раны. Эти антигена можно использовать также для регуляции популяций нормальных макрофагов в легких, поскольку острые и хронические воспалительные легочные заболевания связаны с осуществляемой одноядерными фагоцитами секвестрацией в легких.

Антигена против белка S100 можно использовать также для лечения ревматоидного артрита, предотвращая привлечение моноцитов в синовиальную жидкость суставов. Приток нейтрофилов и моноцитов и их активация играют значительную роль в патогенезе как дегенеративных, так и воспалительных артропатий.

Антигена против белка S100 можно использовать, чтобы помешать разрушительному каскаду с

участием IL-1 и TNF, предотвращающему биосинтез других воспалительных цитокинов. При этом антагонисты полипептидов S100 или соответствующих полинуклеотидов можно использовать для предотвращения воспаления. Антагонисты полипептидов S100 или соответствующих полинуклеотидов можно использовать также для подавления независимой от простагландинов лихорадки, вызываемой хемокинами, ассоциированными с белками S100.

Антитела против белка S100 можно использовать также в сочетании с IL-10, участвующим в ослаблении миграции нейтрофилов в место воспаления, например (не ограничиваясь перечисленным здесь) при болезни Крона или язвенном колите.

Антитела против белка S100 можно использовать также для лечения случаев недостаточности костного мозга, например, при апластической анемии и миелодиспластическом синдроме. Или же антитела против белка S100 можно использовать для лечения или предотвращения реакции отторжения трансплантата. Антитела против белка S100 можно использовать также для лечения астмы и аллергии, предотвращая скопление эозинофилов в легких. Антагонисты полипептидов S100 или соответствующих полинуклеотидов можно использовать в композициях с фармацевтически приемлемыми носителями, как описано ниже в настоящем документе.

В частности, данным изобретением предлагается способ лечения воспалительного состояния, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиций.

В частности, воспалительное состояние, подлежащее такому лечению, выбирают из следующих расстройств: ревматоидный артрит, астма, подагра, диабет типа I, болезнь Крона, системная красная волчанка, рассеянный склероз, воспалительные заболевания кишечника (IBD), язвенный колит, хронические воспалительные процессы, псориаз или метастазирующий рак. В частности, воспалительное состояние, подлежащее указанному лечению, является ревматоидным артритом. В другом воплощении данного изобретения воспалительное состояние, подлежащее указанному лечению, является хроническим воспалительным заболеванием. Хронические воспалительные заболевания, подлежащие лечению по данному изобретению, включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) пиогенный артрит, гангренозную пиодермию, угревую сыпь, болезнь Стилла взрослых и системный ювенильный идиопатический артрит.

Также данным изобретением предлагается способ иммунотерапии, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиций.

В другом воплощении данного изобретения предлагается способ лечения нейродегенеративных заболеваний, связанных с Toll-подобным рецептором 2 (TLR-2), включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиций. В частности, подлежащими такому лечению нейродегенеративными заболеваниями являются болезни Паркинсона и Альцгеймера.

Также данным изобретением предлагается способ диагностирования или лечения связанных с TLR-2 состояний в клетках, ткани, органе или животном организме, включающий этап введения в нуждающиеся в том клетки, ткани, органы или животный организм эффективного количества описанных в настоящем документе антител или композиций.

В другом воплощении данного изобретения предлагаются терапевтические подходы с использованием антител, включающие введение антител, специфичных против белков S100, животным, предпочтительно млекопитающим, наиболее предпочтительно людям для лечения одного или более из указанных в настоящем документе заболеваний, расстройств или состояний.

В частности, описанные в настоящем документе антитела вводят в организм подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрисуставно или внутривнутрибрюшинно.

Примеры

Пример 1. Получение моноклональных антител 6B4

Самок мышей линии BALB/c возрастом 4 недели иммунизировали путем внутривнутрибрюшинной инъекции 30 мкг очищенного рекомбинантного белка S100A9, разведенных в 50 мкл физиологического раствора, забуференного фосфатом (PBS; Sigma-Aldrich), не содержащего эндотоксинов и смешанного с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Антительный ответ усиливали, делая через 14 суток инъекцию S100A9 с неполным адьювантом Фрейнда и через 28 суток - последнюю инъекцию только белками. На 31-е сутки у иммунизированных мышей брали клетки селезенки, сливали их с мышинными миеломными клеткам линии SP2 и культивировали в селективной среде, содержащей гипоксантин/аметоптерин/тимидин.

Проводили скрининг супернатантов культуральной среды от гибридом методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), используя планшеты, покрытые рекомбинантным белком (1 мкг/мл) в карбонатном буферном растворе (0,1 М; pH 9.6). Положительные гибридомы клонировали методом лимитирующего разведения.

Моноклональные антитела 6B4 наиболее выраженно узнавали рекомбинантный белок S100A9; их изотип был идентифицирован как к-IgG1. Специфичность моноклональных антител 6B4 была подтверждена методами ELISA и вестерн-блоттинга (см. фиг. 1 и 2).

Пример 2. Гуманизация мышинных моноклональных антител 6B4

Для гуманизации мышинных моноклональных антител 6B4 применяли компьютерное моделирование с использованием подхода "прививки" участков, определяющих комплементарность (CDR). При этом осуществлялись следующие этапы.

Трехмерное моделирование переменных областей мышинных моноклональных антител 6B4

Эту задачу решали путем моделирования по гомологии. Наиболее сходные матричные структуры для переменных последовательностей мышинных антител 6B4 определяли путем поиска с помощью программы BLAST в банке данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот (PDB). Для построения исходной модели переменной области мышинного антитела 6B4 использовали следующие матричные структуры (указаны коды PDB): 1QOK (цепь A) для легкой цепи и 1I3G (цепь H) для тяжелой цепи. Другие пригодные матрицы можно найти по записям в PDB 1SY6, 3IXY, 2W9D, 3NCY, 3I50 и 1FIG для легкой цепи и 1H8S, 2NTF, 1CIC, 1H8N и 1Z3G для тяжелой цепи. Требовавшиеся мутации вносили в эти матричные структуры согласно последовательностям мышинных антител 6B4: 15 мутаций в легкой цепи 1QOK и 18 мутаций в тяжелой цепи 1I3G. Мутантные структуры, соответствующие тяжелой и легкой цепям переменных областей мышинных антител 6B4, собирали в двухцепочечные антительные структуры, накладывая тяжелые и легкие цепи соответствующих матричных структур. Полученные в результате структуры переменного домена собранных 6B4 уточняли, проводя сперва процедуру минимизации энергии в силовом поле AMBER, затем поэтапное снятие ограничений, начиная от петель CDR и кончая тяжелыми атомами скелета каркасного участка (последний этап). В каждом переменном домене молекулы антитела петля CDR-H3 затем уточнялась путем минимизации энергии возможных конформаций по методу Монте-Карло (MCM); при этом на каждом цикле MCM брали значения диэдрических углов в области CDR-H3, после чего проводили процедуру минимизации энергии предварительно определенной области, простирающейся на 10 Å вокруг исходной конформаций петли CDR-H3. Изображение смоделированной переменной области мышинного антитела 6B4 представлено на фиг. 3 (слева; выравнивание см. на фиг. 5). По данным PDB также были идентифицированы структуры человеческих или гуманизованных последовательностей, наиболее сходных с каждой из переменных последовательностей 6B4, и затем их наложили на смоделированные структуры переменных доменов мышинных антител 6B4. Эти структуры следующие (указаны записи в PDB): 3NFP, 1AD0, 3L5X, 2V7N и 3GIZ для легкой цепи и 1I9R, 3NFP, 1UJ3, 3GKW и 1WT5 для тяжелой цепи. Эти структуры использовали при моделировании мутаций в каркасном участке, чтобы построить трехмерные структуры гуманизованных антител, исходя из смоделированной трехмерной структуры мышинного антитела.

Свойства аминокислотных последовательностей мышинных антител 6B4 и смоделированных структур

Этот этап служил для оценки степени гуманизации, индекса соответствия при контакте с антигеном, для определения CDR, канонических аминокислотных остатков, аминокислотных остатков, участвующих в контакте тяжелой и легкой цепей (VH/VL), аминокислотных остатков, участвующих в контакте переменной и константной областей в тяжелой и в легкой цепях (VH/CH и VL/CL), необычных каркасных участков, возможных сайтов N- и O-гликозилирования, аминокислотных остатков, погруженных остатков в зоне Вернье и поблизости от CDR. Для оценки указанных свойств использовали источники, доступные в Интернете, и локальное программное обеспечение.

Отбор наилучших каркасных участков легких и тяжелых цепей

человеческих антител для мышинных участков, определяющих комплементарность (CDR).

Эту задачу решали стандартным сравнением по гомологии, используя локальную копию базы данных зародышевых линий человека (Vbase), другие библиотеки последовательностей (Genbank и SwissProt), а также набор консенсусных последовательностей каркасных участков человеческих антител. Проводили поиск с помощью программы BLAST, чтобы изъять совпадения в последовательностях с наивысшей степенью гомологии только в каркасных участках (таким образом исключались гиперпеременные участки), в то же время устанавливая соответствия по длине петель CDR. Каркасные участки человеческих антител, идентифицированные для легких и тяжелых цепей антител 6B4, соответствовали классам k3 и h1. В дополнение к человеческим консенсусным последовательностям для указанных классов оставляли несколько последовательностей каркасных участков зародышевой линии человека, наиболее сходных с последовательностями каркасных участков антител 6B4 (см. выравнивания на фиг. 5 и 6).

Идентификация аминокислотных остатков каркасных участков для

обратных мутаций и разработка множества вариантов гуманизованных последовательностей

Этот важный этап позволяет установить аминокислотные остатки, которые нужно с особой точностью подвергнуть мутации для совпадения с соответствующей человеческой последовательностью. В случае потери аффинности эти аминокислотные остатки являются первоочередными кандидатами на обратную мутацию в сторону мышинных последовательностей. Данная процедура основывается на идентификации аминокислотных остатков одной или более из следующих категорий: канонические, CDR-H3, находящиеся в зоне Вернье, необычные, расположенные проксимально от CDR (в пределах 5 Å), расположенные в областях контактирования легких и тяжелых цепей, расположенные в сайтах гликозилирования. Такие аминокислотные остатки впрямую или опосредованно могут влиять на участки связывания

с антигеном и аффинность антитела. При решении вопроса о том, возможно ли безопасное мутирование того или иного аминокислотного остатка мышиной последовательности в сторону человеческой последовательности, также весьма важны индекс соответствия при контакте с антигеном и встречаемость данной аминокислоты в каждом положении последовательности по базам данных человеческих зародышевых линий. В легкой цепи антител 6B4 требуется 26 мутаций в ее предполагаемом для гуманизации каркасном участке для его 100%-ной гуманизации. В тяжелой цепи антител 6B4 требуется 18 мутаций в ее предполагаемом для гуманизации каркасном участке для его 100%-ной гуманизации. В наиболее гуманизированных последовательностях антител 6B4 степень гуманизации составляет 98,8% относительно соответствующих наиболее близких человеческих каркасных участков (см. выравнивания на фиг. 5 и 6); они обозначены 6B4-VL_гуманизированные-1 (SEQ ID NO: 2) и 6B4-VH_гуманизированные-1 (SEQ ID NO: 25). Были также разработаны дополнительные гуманизированные последовательности, где на основании тщательного структурного анализа и сравнительного анализа последовательностей, результаты которого указывали на высокую вероятность влияния вводимых мутаций в определенных положениях на средство связывания с антигеном, сохранили несколько дополнительных аминокислотных остатков последовательностей мышинных антител 6B4. Эти последовательности обозначены 6B4-VL_гуманизированные-2 (SEQ ID NO: 21), 6B4-VL_гуманизированные-3 (SEQ ID NO: 22), 6B4-VL_гуманизированные-4 (SEQ ID NO: 23), 6B4-VH_гуманизированные-2 (SEQ ID NO: 41). Из последовательностей четырех гуманизированных легких цепей и двух гуманизированных тяжелых цепей можно собрать восемь вариантов гуманизированных антител.

Вариант 1 гуманизированной легкой к-цепи антител 6B4 (SEQ ID NO: 42)

**MVLQQTQVFI SLLLWISGAYGENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSARSSVSVVHWHYQQKPGQAPR
LLIYDTSKLAGSIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCFQGSQGYPLTFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

Вариант 2 гуманизированной легкой к-цепи антител 6B4 (SEQ ID NO: 43)

**MVLQQTQVFI SLLLWISGAYGENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSARSSVSVVHWHYQQKPGQAPK
LWIYDTSKLAGSVPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCFQGSQGYPLTFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

Вариант 3 гуманизированной легкой к-цепи антител 6B4 (SEQ ID NO: 44)

**MVLQQTQVFI SLLLWISGAYGENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSARSSVSVVHWHYQQKPGQAPK
LWIYDTSKLAGSVPARFSGSGSGNDYTLTISLLEPEDFAVYYCFQGSQGYPLTFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

Вариант 4 гуманизированной легкой к-цепи антител 6B4 (SEQ ID NO: 45)

**MVLQQTQVFI SLLLWISGAYGENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSARSSVSVVHWHYQQKPGQSPK
LWIYDTSKLAGSVPARFSGSGSGNSYTLTISLLEPEDFAVYYCFQGSQGYPLTFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

Вариант 1 гуманизированной тяжелой (Igg4) цепи антител 6B4 (SEQ ID NO: 46)

**MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTTYWIHWVRQAPGQGL
EWMGNIYPGGDSSNYDEKVKSRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCSRWGIWGQGLVLT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNNHT
QKSLSLSLGK**

Вариант 2 гуманизированной тяжелой (Igg4) цепи антител 6B4 (SEQ ID NO: 47)

**MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTTYWIHWVRQAPGQGL
EWIGNIYPGGDSSNYDEKVKSRATLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCSRWGIWGQGLVLT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNNHT
QKSLSLSLGK**

Химерная тяжелая цепь (Igg4) антител 6B4 (SEQ ID NO: 48)

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLQQPGSELVLRPGASVKLSCKASGYTFTTYYIHWVRQRPGQGL
 EWIGNIYPGGDSSNYDEKVKSRATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCSRWGIWGQGLVLT
 VSA**A**ASTKGPSVF**P**LAPCS**R**STSE**S**TAA**L**GCLV**K**DY**F**PE**P**VT**V**SW**N**SG**A**L**T**SG**V**H**T**F**P**AV**L**Q**S**S**G**
LY**S**L**S**SV**V**T**V**P**S**SL**G**T**K**T**Y**T**C**N**V**D**H**K**P**S**N**T**K**V**D**K**R**V**E**S**K**Y**G**P**P**C**P**S**C**P**A**P**E**F**L**G**G**P**S**V**F**L**F**P**P**
KP**K**D**T**L**M**I**S**R**T**P**E**V**T**C**V**V**V**D**V**S**Q**E**D**P**E**V**Q**F**N**W**V**D**G**V**E**V**H**N**A**K**T**K**P**R**E**E**Q**F**N**S**T**Y**R**V**S**V**L**T**V**L
HQ**D**W**L**N**G**K**E**Y**K**C**K**V**S**N**K**L**P**S**S**I**E**K**T**I**S**K**A**K**G**Q**P**R**E**P**Q**V**Y**T**L**P**P**S**Q**E**E**M**T**K**N**Q**V**S**L**T**C**L**V**K**G**F**Y**
PS**D**I**A**V**E**W**E**S**N**G**Q**P**E**N**N**Y**K**T**T**P**P**V**L**D**S**D**G**S**F**F**L**Y**S**R**L**T**V**D**K**S**R**W**Q**E**G**N**V**F**S**C**S**V**M**H**E**A**L**H**N**H**Y**T
QK**S**L**S**L**S**L**G**K

Сигнальная последовательность (человеческая) выделена черным цветом. Варибельная область (гуманизированная или мышьяная) выделена курсивом. Константная область (человеческая) выделена жирным шрифтом. Молекулярная модель антител 6B4-VL_гуманизированных-1 (SEQ ID NO: 2): пара 6B4-VH_гуманизированных-1 (SEQ ID NO: 25), сконструированная путем моделирования по гомологии, исходя из трехмерной модели варибельной области мышьяных антител 6B4, как показано на фиг. 3 (справа).

В случае последовательности легкой цепи антител 6B4-VL_гуманизированных-2 (SEQ ID NO: 21) были дополнительно сохранены аминокислотные остатки каркасных участков из мышьяной последовательности Trp-L47, Lys-L45 и Val-L58, поскольку аминокислотный остаток Trp-L47 входит в состав зоны Вернье, поддерживающей участок CDR-L2, и его мутация в лейцин (Leu) может повлиять на конформацию этой петли, а аминокислотные остатки Lys-L45 и Val-L58 непосредственно контактируют с Trp-L47 и должны подлежать мутированию вместе с ним. Аминокислотные остатки Trp-L47 и Val-L58 погружены и не должны влиять на иммуногенность, тогда как аминокислотный остаток Lys-L45 расположен близко к участку CDR-H3. Кроме того, остаток лизина в положении 45 и валина в положении 58 присутствуют в каркасных участках человеческих антител.

Основой последовательности легкой цепи антител 6B4-VL_гуманизированных-3 (SEQ ID NO: 22) является последовательность 6B4-VL_гуманизированных-2 с двумя обратными мутациями для введения остатков Asn-L69 и Tyr-L71 из мышьяной последовательности, которые входят в состав зоны Вернье, поддерживающей участок CDR-L1, причем остаток Tyr-L71 частично экспонирован на поверхности молекулы и обладает сродством связывания к антигену.

Последовательность легкой цепи антител 6B4-VL_гуманизированных-4 (SEQ ID NO: 23) привносит еще две обратные мутации в 6B4-VL_гуманизированные-3, а именно Ser-L43 и Asp-L70. Мутация в положении 70 изменяет электрический заряд на поверхности молекулы недалеко от участка CDR-L1. Остаток Ser-L43 контактирует с тяжелой цепью. Остаток серина (Ser) в положении 43 присутствует в каркасных участках человеческих антител.

В случае последовательности тяжелой цепи антител 6B4-VH_гуманизированных-2 (SEQ ID NO: 41) были дополнительно сохранены аминокислотные остатки каркасных участков из мышьяной последовательности Ile-H48, Ala-H67, Leu-H69 и Val-H71, что позволило восстановить четыре аминокислотных остатка зоны Вернье, поддерживающей CDR-H2, которые, как было показано, важны для сродства связывания гуманизированных антител с антигеном. Отметим, что все эти аминокислотные остатки погружены, а остаток валина (Val) в положении 71 присутствует в каркасных участках человеческих антител.

Эти данные суммированы в таблице и на фиг. 4, где представлены также обратные мутации во всех вариантах гуманизированных последовательностей.

| Вариант | Степень гуманизированности каркасных участков (%) | Заряд варибельного домена | Количество аминокислотных остатков из мышных последовательностей | Обратные мутации | Примечания | SEQ ID NO. |
|--------------------|---|---------------------------|--|---|--|------------|
| 6B4-VL | | | | | | |
| Гуманизированные-1 | 98, 8 | 0 | 1 | I2N | - N-концевой полужспонированный остаток (N2) обладает свойством связывания антигена и входит в состав зоны Вернье | 2 |
| Гуманизированные-2 | 95, 0 | 0 | 4 | I2N, L47W, R45K, I58V | - Остаток W47 в зоне Вернье под CDR-L2, мутация которого в лейцин влияет на конформацию этой петли - остатки в положениях 45 и 58 непосредственно контактируют с остатком в положении 47 и подлежат мутации вместе с ним - остатки W45 and V47 погружены; остаток K43 находится близко к участку CDR-H3 - остаток лизина (Lys) в положении 45 и валина (Val) в положении 58 присутствуют в каркасных участках человеческих антител. | 21 |
| Гуманизированные-3 | 92, 5 | 0 | 6 | I2N, L47W, R45K, I58V, T69N, F71Y | - остатки в положениях 69 и 71 входят в состав зоны Вернье поддерживающей CDR-L1 - остаток в положении 71 погружен и может контактировать с антигеном | 22 |
| Гуманизированные-4 | 90, 0 | 1 | 8 | I2N, L47W, R45K, I58V, T69N, F71Y, A43S, D70S | - мутации остатка в положении 70 влияют на электрический заряд участка поверхности недалеко от CDR-L1 - остаток в положении 43 контактирует с тяжелой цепью - остаток серина (Ser) в положении 43 присутствует в каркасных участках человеческих антител. | 23 |
| Химерные | 68, 8 | 1 | 25 | См. выравнивание | | 1 |
| 6B4-VH | | | | | | |
| Гуманизированные-1 | 98, 8 | 1 | 1 | A93S | - погруженный остаток S93 зоны Вернье расположен вблизи от CDR-H3 | 25 |
| Гуманизированные-2 | 93, 9 | 1 | 5 | A93S, M48L, V67A, I69L, A71V | - восстановление четырех аминокислотных остатков зоны Вернье поддерживающих CDR-H2 важно для средства связывания с антигеном гуманизированных антител. - все эти остатки погружены - Остаток валина (Val) в положении 71 присутствует в каркасных участках человеческих антител. | 41 |
| Химерные | 79, 3 | 1 | 17 | См. выравнивание | | 24 |

Пример 3. Локализация эпитопа, узнаваемого моноклональными антителами 6B4 против S100A9

Чтобы начать картирование эпитопов, были выбраны три области человеческого белка S100A9: N-концевая, шарнирная и C-концевая. Их аминокислотные последовательности следующие.

Полная аминокислотная последовательность человеческого белка S100A9

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE HIMEDLDTNA DKQLSFEEFI MLMARLTWAS HEKMHEGDEG PGHNNKPGLG EGTP (SEQ ID NO: 49)

Последовательности областей человеческого белка S100A9

N-концевая (N) MTCKMSQLERNI (SEQ ID NO: 50)

Шарнирная (H) DLQNFLK KENKNEK (SEQ ID NO: 51)

C-концевая (C) TWASHEKMHEGDEGPGHNNKPGLGEGTP (SEQ ID NO: 52)

Вначале проводили анализ методом дот-блоттинга, чтобы проверить способность моноклональных антител 6B4 узнавать области белка S100A9. Вкратце, проделывали следующее. Рекомбинантный белок S100A9 или S100A8 (отрицательный контроль) в количестве 1 мкг и пептиды S100A9 (10 мкг и 50 мкг) наносили на мембрану PVDF. Высушенную мембрану блокировали [TBS/Tween (0,1%)/молоко (5%)] в течение 30 мин при комнатной температуре, осторожно перемешивая, и метили моноклональными антителами 6B4 (1 мкг/мл) в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану хорошо промывали раствором TBS/0, 1% Tween, после чего метили козьими антителами против мышинового иммуноглобулина (1/20 000) в блокирующем буферном растворе в течение 1 ч при комнатной температуре, осторожно перемешивая. Затем мембрану хорошо промывали и визуализировали методом усиленной хемилюминесценции (ECL) по инструкции производителя (PerkinElmer).

C-концевой участок белка S100A9 разделили на 7 пептидов следующим образом:

C-конц TWASHEKMHEGDEGPGHNNKPGLGEGTP (SEQ ID NO: 52)

C1 TWASHEKMH (SEQ ID NO: 53)

C2 SHEKMHEGD (SEQ ID NO: 54)

C3 KMHEGDEGP (SEQ ID NO: 55)

C4 EGDEGPGHH (SEQ ID NO: 56)

C5 EGP GHHNKP (SEQ ID NO: 57)

C6 GHNNKPGLG (SEQ ID NO: 58)

C7 HKPGLGEGTP (SEQ ID NO: 59)

Чтобы установить, какой участок C-концевой области белка S100A9 узнают антитела 6B4, проводили анализ методом дот-блоттинга, как описано выше (см. фиг. 7 и 8).

Результаты, полученные методом дот-блоттинга, были подтверждены прямым ELISA. Вкратце, проделывали следующее. В лунки 96-луночного планшета с высоким связыванием вносили в возрастающих концентрациях указанные пептиды в растворе NaHCO₃ (0,1 M; pH 9,6) и оставляли на ночь при температуре 4°C. Планшеты хорошо промывали раствором PBS1x/0,1% Tween и блокировали раствором PBS1x/0,1% Tween/2% бычий сывороточный альбумин (BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого промывали три раза и добавляли в лунки по 100 мкл раствора, содержащего 2 мкг/мл антител 6B4; инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли в лунки по 100 мкл раствора, содержащего пероксидазу хрена, конъюгированную с козьими антителами

против мышинового иммуноглобулина (1/10 000); инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и обрабатывали субстратом пероксидазы хрена -тетраметилбензидинсульфонатом (ТМБС) согласно инструкциям производителя. Реакцию останавливали серной кислотой и снимали показания спектрофотометра на длине волны 450 нм (см. фиг. 9).

Таким образом, моноклональные антитела против белка S100A9 связываются с пептидом C7 его С-концевой области, как показано на фиг. 10. Как видно на фиг. 16, блокирующие кроличьи моноклональные антитела узнают шарнирный участок или С-концевой пептид белка S100A9. Моноклональные антитела 1B5 и 7A8 связываются с С-концевой областью белка S100A9. Моноклональные антитела 6C1 связываются с шарнирным участком.

В частности, моноклональные антитела 1B5 и 7A8 связываются с десятью последними аминокислотными остатками С-концевой области белка S100A9 (пептид C7; см. фиг. 17).

Чтобы определить эпитоп, с которым связываются моноклональные антитела 6B4, пептиды C6 и C7 разделили на более короткие пептиды, как показано ниже.

| | | |
|---------|------------------------------|-----------------|
| С-конец | TWASHEKMHGDEGPGHNNHKPGLGEGTP | (SEQ ID NO: 52) |
| C6a | GPQHNNKP | (SEQ ID NO: 60) |
| C6b | PGHNNKPG | (SEQ ID NO: 61) |
| C6c | GHNNKPGL | (SEQ ID NO: 62) |
| C6d | HNNKPGLG | (SEQ ID NO: 63) |
| C6e | HNNKPGLGE | (SEQ ID NO: 64) |
| C6f | HKPGLGEG | (SEQ ID NO: 65) |
| C6g | KPGLGEGT | (SEQ ID NO: 66) |
| C7 | HKPGLGEGTP | (SEQ ID NO: 59) |
| C7a | PGLGEGTP | (SEQ ID NO: 67) |
| C7b | LGEGTP | (SEQ ID NO: 68) |
| C7c | EGTP | (SEQ ID NO: 69) |

Затем были установлены аминокислотные остатки, существенные для связывания моноклональных антител 6B4. Были получены пептиды, в которых определенные аминокислотные остатки заменили на остаток аланина. Как показано на фиг. 11, для связывания антител 6B4 с эпитопом, расположенным в С-концевой области молекулы белка S100A9, критически важны аминокислотные остатки L109, G110, T113 и в меньшей степени E111 и P114. Фиг. 12 показывает, что замена остатка P107 на остаток аланина усиливает связывание белка S100A9 с антителами 6B4, тогда как остатки G108 и G112 не существенны для этого.

Была определена аминокислотная последовательность эпитопа: PGLGEGTP (SEQ ID NO: 67; аминокислотные остатки, существенные для связывания с антителами, выделены жирным шрифтом, а те, что ограничивают связывание, - курсивом). Исходя из этого, можно заключить, что гуманизированные антитела 6B4 узнают определенный эпитоп молекулы белка S100A9, а именно LGxxTx (SEQ ID NO: 70), LGExTP (SEQ ID NO: 71) или PGLGExTP (SEQ ID NO: 72).

Как показывает фиг. 13, гуманизированные антитела 6B4 обладают сходной способностью узнавать белок S100A9 и его С-концевую область.

Пример 4. Антитела против белка S100A9 блокируют активацию Toll-подобного рецептора 2 (TLR2)

Клетки THP1 (XBlue™) (1×10^5) предварительно обрабатывали реагентом, блокирующим Fc-рецепторы (Fc Block; BD Biosciences) в течение 10 мин при температуре 37°C. Затем клетки инкубировали в течение 24 ч с белком S100A8 или S100A9 в возрастающих концентрациях в присутствии или в отсутствие антител против TLR2, TLR4, RAGE (10 мкг/мл) или их соответствующих изотипических контролей. После этого клетки центрифугировали, собирали супернатанты и инкубировали их с колориметрической репортерной системой Quanti-Blue™, дающей фиолетовую окраску в присутствии щелочной фосфатазы. Уровни секреции щелочной фосфатазы определяли спектрофотометрически на длине волны 650 нм.

Связывание белка S100A9 с TLR2 сравнивали со связыванием TLR4 и RAGE, предположительно являющихся рецепторами для этих белков. Клетки THP1(Xblue) обрабатывали белком S100A9 (10 мкг/мл) в присутствии или в отсутствие антител против TLR2, TLR4 или RAGE (100 мкг/мл). Антитела против RAGE не подавляли стимуляцию клеток THP-1, антитела против TLR4 умеренно подавляли экспрессию репортерного гена щелочной фосфатазы (см. фиг. 14). В противоположность этому антитела против TLR2 приблизительно на 50% угнетали секрецию щелочной фосфатазы в ответ на белок S100A9. Этот эффект возрастал до 85%, когда отношение антитела:стимулирующий белок (1 мкг/мл S100A9; см. фиг. 15) увеличивали до 10:1. Как и ожидалось, в концентрациях меньше 40 мкг/мл белок S100A12 не стимулировал клетки THP1(Xblue). Эти результаты свидетельствуют, что основным рецептором для белка S100A9 является TLR2.

Хотя в настоящем описании приводятся конкретные воплощения данного изобретения, следует принять во внимание, что возможны их модификации и что настоящая заявка охватывает любые вариан-

ты, применения или адаптации данного изобретения, включая такие отступления от настоящего описания, которые проистекают из известной или традиционной в данной области техники практики и которые применимы к существенным признакам изобретения, представленным в настоящем документе, в пределах прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-S100A9 антитело, которое специфическим образом блокирует взаимодействие между S100A9 и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2) и ингибирует активность TLR2, которое является гуманизированным антителом и содержит варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 2, 21, 22 и 23, и варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 25 и 41.

2. Антитело по п.1, адаптированное для ингибирования связывания указанного белка S100A9 с TLR2.

3. Антитело по п.1 или 2, в котором указанное антитело связывается с эпитопом на С-конце или шарнирном участке белка S100A9.

4. Антитело по любому из пп.1-3, в котором указанное антитело связывается с 10 последними аминокислотными остатками С-концевого участка белка S100A9.

5. Антитело по любому из пп.1-4, в котором указанное антитело узнает уникальный эпитоп на молекуле белка S100A9, обозначенный как LGExTP (SEQ ID NO: 71), PGLGExTP (SEQ ID NO: 72) или PGLGEGTP (SEQ ID NO: 67).

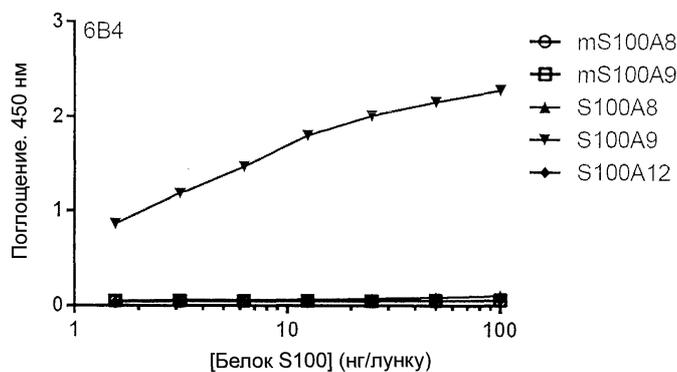
6. Антитело по любому из пп.1-5, содержащее аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 25, 41, 46, 47 и 48.

7. Композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-6 и физиологически или фармацевтически приемлемый эксципиент, для лечения воспалительного заболевания или воспалительного состояния.

8. Композиция по п.7, где указанное воспалительное заболевание выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита, астмы, подагры, болезни Крона, системной красной волчанки, рассеянного склероза, воспалительных заболеваний кишечника (IBD), язвенного колита, хронических воспалительных процессов и псориаза.

9. Композиция по п.7, где указанное воспалительное состояние связано с заболеванием, выбранным из диабета типа I и метастазирующего рака.

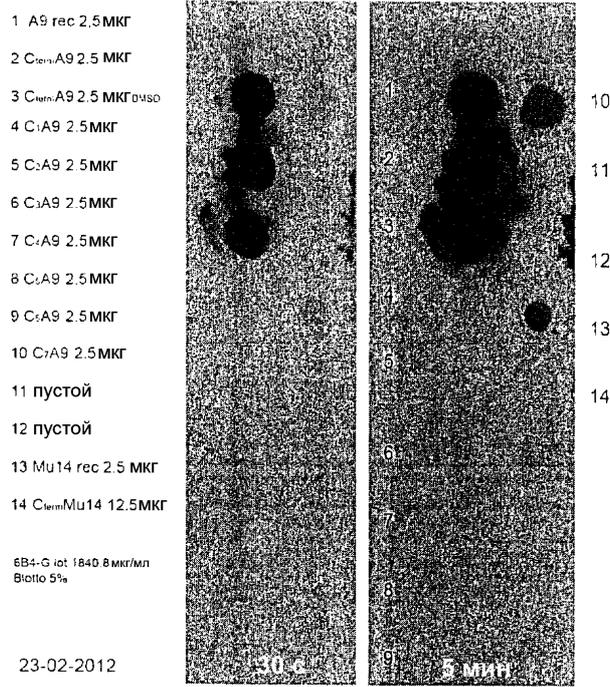
10. Композиция по п.8, где указанное воспалительное состояние является хроническим воспалительным заболеванием.



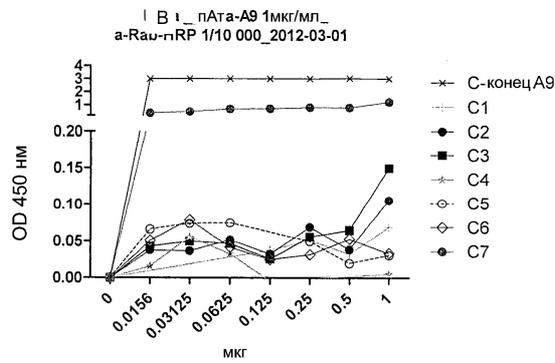
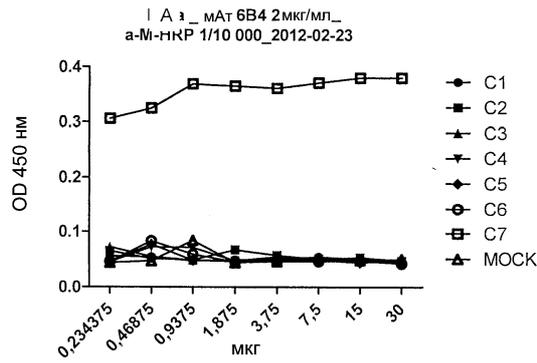
Фиг. 1



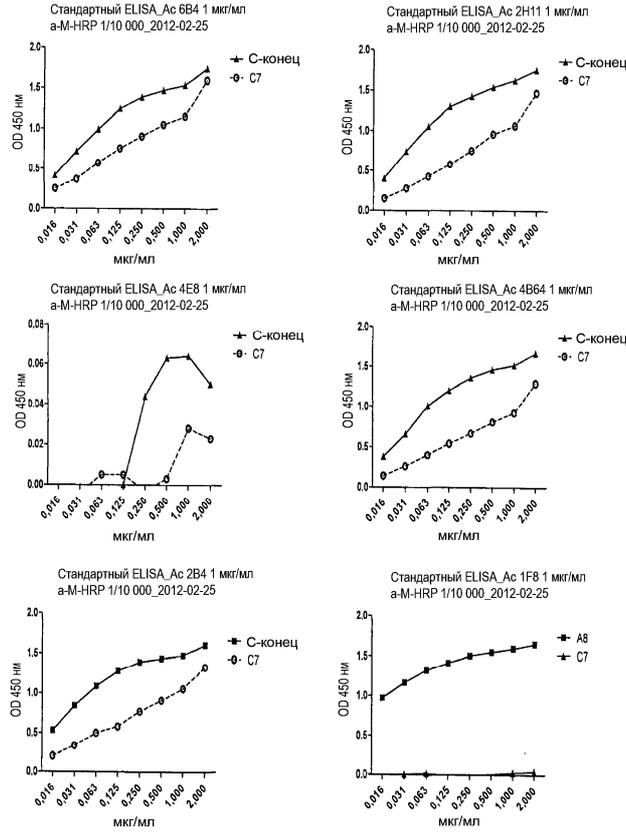
Фиг. 2



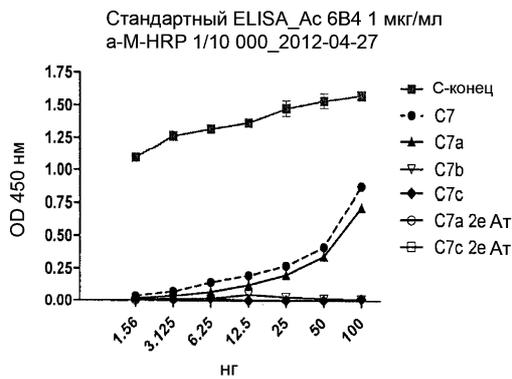
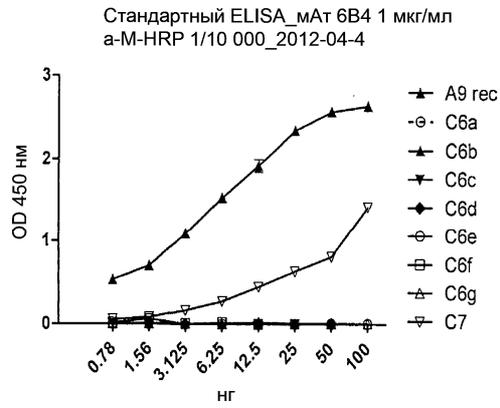
Фиг. 8



Фиг. 9



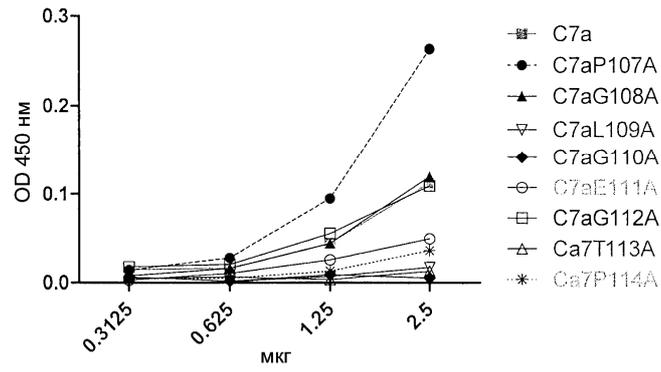
Фиг. 10



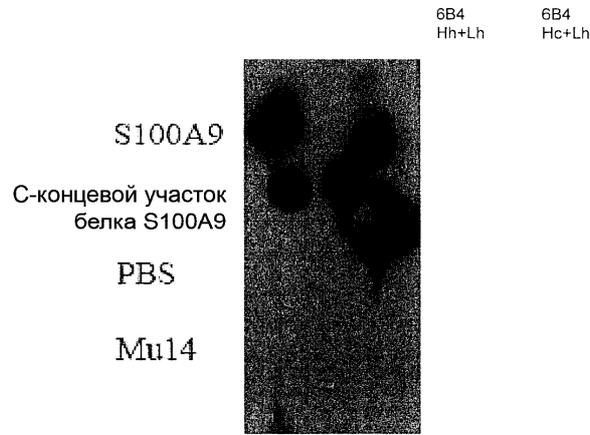
Фиг. 11

040375

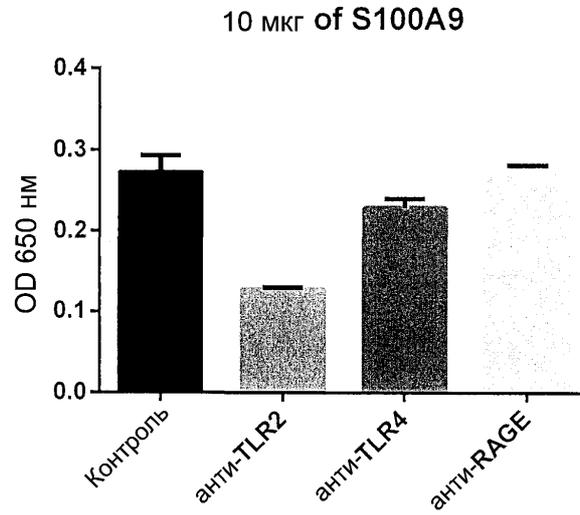
ELISA_мАт 6B4 1 мкг/мл (lot 657.9 мкг/мл 20120305)_
а-M-HRP 1/10 000_2012-06-13



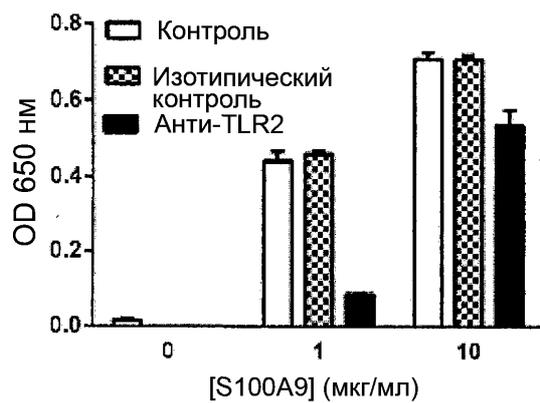
Фиг. 12



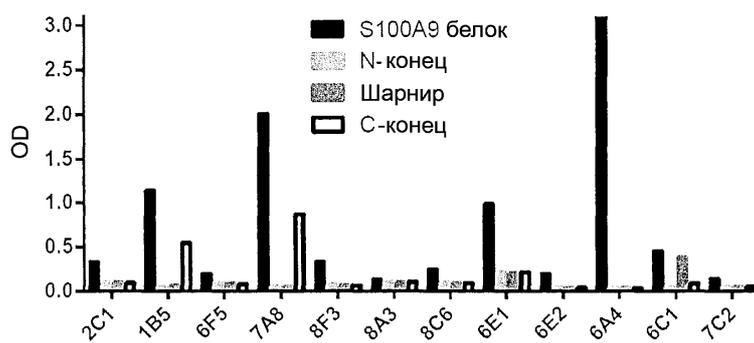
Фиг. 13



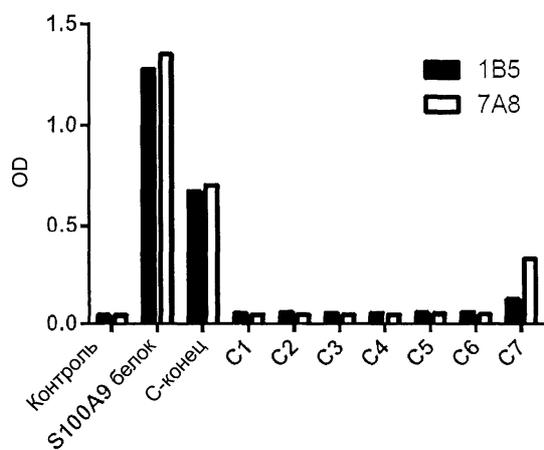
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

