



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.09.21

(21) Номер заявки

201592285

(22) Дата подачи заявки

2014.05.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРУ ОНКОСТАТИНА М И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/829,082**

(32) **2013.05.30**

(33) **US**

(43) **2016.05.31**

(86) **PCT/US2014/040360**

(87) **WO 2014/194274 2014.12.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**КИНИКСА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ЛТД (ВМ)**

(72) Изобретатель:

**Арнетт Хитер А., Эскобар Сабин С.
(US), Кинг Чэдвик Т. (СА), Лим Ан
Чин, Нараянан Сараванакумар,
Вейнреб Пол Х., Педерсон Нельс Э.
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-2006171951**

DIVEU C. ET AL.: "Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling", EUROPEAN CYTOKINE NETWORK, JOHN LIBBEY EUROTTEXT LTD, FR, vol. 15, no. 4, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 291-302, XP002397783, ISSN: 1148-5493, the whole document, in particular, antagonist anti-OSMR antibody XR-M70 - see discussion 2

JALAL A. JAZAYERI ET AL.: "Targeting the Glycoprotein 130 Receptor Subunit to Control Pain and Inflammation", JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH, vol. 30, no. 12, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 865-873, XP055143486, ISSN: 1079-9907,

DOI: 10.1089/jir.2010.0035, the whole document, in particular Fig. 1

REPOVIC PAVLE ET AL.: "Oncostatin-M induction of vascular endothelial growth factor expression in astrogloma cells", ONCOGENE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 22, no. 50, 6 November 2003 (2003-11-06), pages 8117-8124, XP009125279, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/SJ.ONC.1206922, the whole document, in particular the section "Reagents" and p. 8120, col. 2, 3

Anomynous: "SA1290581 align light chain", 29 September 2014 (2014-09-29), XP055143314, retrieved from the Internet: URL:q/ibis [retrieved on 2014-09-29], the whole document

Anomynous: "SA1290581 Heavy chain align", 29 September 2014 (2014-09-29), XP055143316, retrieved from the Internet: URL:q/ibis [retrieved on 2014-09-29], the whole document

Anomynous: "SA1290581 identity of SEQ ID NO: 29", 29 September 2014 (2014-09-29), XP055143370, retrieved from the Internet: URL:q/ibis [retrieved on 2014-09-29]

RUDIHOFF S. ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979, the whole document

PANKA D.J. ET AL.: "Variable Region Framework Differences Result in Decreased or Increased Affinity of Variant Anti-Digoxin Antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 85, no. 9, 1 May 1988 (1988-05-01), pages 3080-3084, XP000611718, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.85.9.3080, the whole document

(57) В изобретении предложены антитела к рецептору-β онкостатина М (OSMR). Антитела к OSMR препятствуют связыванию OSM и/или IL-31 с OSMR. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к OSMR представляют собой удобные инструменты для изучения заболеваний и нарушений, связанных с OSMR, и являются в особенности полезными в лечении заболеваний и нарушений, связанных с OSMR и связыванием OSM и/или IL-31 с OSMR.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/829082, поданной 30 мая 2013 г., содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Онкостатин М (OSM) и интерлейкин-31 (IL-31) являются представителями суперсемейства IL-6 и содержат общую субъединицу рецептора - рецептор-β онкостатина М (OSMR) (Dillon et al., *Nat. Immunol.* 5(7):752-60, 2004). Все представители этого семейства, за исключением IL-31, содержат общую цепь гликопротеина 130 (gp130) в своих мультимерных рецепторных комплексах. Передача сигнала OSM происходит посредством гетеродимерного рецепторного комплекса, содержащего OSMR и gp130, в то время как в IL-31 используется gp130-подобный рецептор IL-31R в комбинации с OSMR (Dillon et al., выше; Dreuw et al., *J. Biol. Chem.* 279(34):36112-20, 2004). В общем случае OSMR и gp130 экспрессируются фактически во всех тканях и типах клеток и могут индуцироваться в разных условиях стимуляции. Экспрессия IL-31R является более ограниченной и строго регулируемой. Как у людей, так и у мышей экспрессия мРНК IL-31R выявляема при низких уровнях в таких тканях, как трахея, скелетные мышцы, вилочковая железа и костный мозг (Dillon et al., выше). Хотя их уровень экспрессии резко отличается, как IL-31R, так и OSMR коэкспрессируются во множестве тканей, включая эпителиальные клетки кожи и кишечника, что позволяет предположить, что эти ткани должны отвечать на IL-31 (Dillon et al., выше; Dambacher et al., *Gut* 56(9):1257-65, 2007). В то время как OSMR конститутивно экспрессируется на эпителиальных клетках в легких, уровни экспрессии IL-31R в тканях легких являются пренебрежимо малыми или низкими, но могут быть повышены разными способами стимуляции дыхательных путей (Dillon et al., выше; Jawa et al., *J. Interferon Cytokine Res.* 28(4):207-19, 2008).

Так как OSM и IL-31 секретируются, главным образом, Т-лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами, при многих болезненных состояниях, связанных с воспалением, наблюдается повышающая регуляция их обоих. OSM принимает участие в разнообразных биологических процессах, включая формирование костной ткани, разрушение хрящевой ткани, поглощение холестерина, боль и воспаление (Cawston et al., *Arthritis Rheum.* 41(10):1760-71, 1998; Hasegawa et al., *Rheumatology (Oxford)*, 38(7):612-7, 1999; Levy et al., *J. Hepatol.* 32(2):218-26, 2000; Micourt et al., *Arthritis Rheum.* 43(2):281-8, 2000; de Hooge et al., *Am. J. Pathol.* 160(5):1733-43, 2002; Luzina et al., *Arthritis Rheum.* 48(8):2262-74, 2003; Morikawa et al., *J. Neurosci.* 24(8):1941-7, 2004; Kong et al., *J. Lipid Res.* 46(6):1163-71, 2005). Было продемонстрировано, что при разных обстоятельствах OSM является эффективным модулятором внеклеточного матрикса (ВКМ), что позволяет предположить, что OSM способен опосредовать на первый взгляд противоположные патологические последствия, включая фиброз (избыток ВКМ) и разрушение хрящевой ткани (недостаток ВКМ). В зависимости от типа ткани и окружающей среды оба эти эффекта наблюдали в случаях соответственно сверхэкспрессии или экзогенного введения OSM в легкие или суставы мышей (Richards et al., *Biochem. Soc. Trs.* 30(2): 107-11, 2002; Hui et al., *Arthritis Rheum.* 48(12):3404-18, 2003; Row et al., *Am. J. Pathol.* 162(6):1975-84, 2003). Кроме того, ранее было показано, что в случае человеческих патологий, при которых наблюдаются данные типы последствий, происходит повышающая регуляция OSM (Cawston et al., выше; Hasegawa et al., выше; Levy et al., выше; Micourt et al., выше; Luzina et al., выше). В большинстве случаев наблюдается повышающая регуляция локально действующего цитокина OSM в синовиальной жидкости из суставов пациентов с ревматоидным артритом (РА) (Cawston et al., выше; Micourt et al., выше), в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) пациентов с ассоциированным со склеродермией интерстициальным заболеванием легких (Luzina et al., выше), идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ) и в печени пациентов с циррозом (Levy et al., выше). Возможное влияние на ВКМ со стороны OSM может быть частично связано со способностью OSM изменять баланс между металлопротеиназами матрикса (MMP) и тканевыми ингибиторами MMP (TIMP). TIMP с высокой аффинностью связываются с MMP в соотношении 1:1, что приводит к утрате протеолитической активности MMP. Ранее было показано, что регуляция TIMP-1 и TIMP-3 со стороны OSM происходит по-разному, что приводит к повышению TIMP-1 и снижению TIMP-3 (Gatsios et al., *Eur. J. Biochem.* 241(1):56-63, 1996). Кроме регуляции расщепления компонентов внеклеточного матрикса, MMP вовлечены в расщепление и последующую активацию большого количества белков, включая TGF-β - эффективный профибротический цитокин (Leask et al., *FASEB J.* 18(7):816-27, 2004). Также сообщалось, что OSM способен напрямую индуцировать транскрипцию коллагена типа I *in vitro* (Hasegawa et al., *J. Rheumatol.* 25(2):308-13, 1998).

Экспрессия OSM и IL-31 была обнаружена в кожных тканях пациентов с псориазом и atopическим дерматитом, а мутации в OSMR и IL-31R были связаны с системным кожным амилоидозом. Системная трансгенная сверхэкспрессия IL-31 индуцировала зудящий воспалительный ответ в кожных тканях мышей. Передача сигналов как OSM, так и IL-31 происходит через OSMR на нейронах, где, как предполагается, происходит стимуляция ноцицептивных и зудящих ответов.

Все вместе это связано с человеческими заболеваниями и способностью OSM и IL-31 стимулировать разнообразные патологии, включая, по меньшей мере, воспаление, перестройку внеклеточного матрикса, боль и зуд, что позволяет предположить, что блокирование OSMR представляет собой подходя-

щую цель для терапевтического вмешательства в случае многих заболеваний и нарушений, связанных с OSMR.

Сущность изобретения

В изобретении предложены анти-OSMR антигенсвязывающие белки, например антитела и их функциональные фрагменты, имеющие свойства, подходящие для коммерческого производства и терапевтического применения на людях. Анти-OSMR антигенсвязывающие белки применимы в способах лечения заболеваний и нарушений, связанных с OSMR, и, в частности, тех, которые связаны со связыванием OSM или IL-31 с OSMR. В данном документе предложены OSMR-связывающие антитела, которые связывают OSMR с высокой аффинностью и эффективно блокируют связывание OSM и/или IL-31 с OSMR, снижая, таким образом, OSMR-опосредуемый сигналинг в клетке.

В первом аспекте антигенсвязывающий белок к OSMR содержит а) переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29; б) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11; или с) переменный домен легкой цепи согласно а) и переменный домен тяжелой цепи согласно б).

Предпочтительные антигенсвязывающие белки из первого аспекта включают те, которые содержат переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, и переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9; те, которые содержат переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 28, и переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10; и те, которые содержат переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 29, и переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие переменный домен тяжелой цепи, обладающий определенной выше степенью родства с SEQ ID NO: 9, могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 9. В таких вариантах реализации изобретения переменный домен тяжелой цепи необязательно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие переменный домен тяжелой цепи, обладающий определенной выше степенью родства с SEQ ID NO: 10, могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 10. В таких вариантах реализации изобретения переменный домен тяжелой цепи, необязательно, содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54.

Во втором аспекте антигенсвязывающий белок к OSMR содержит а) переменный домен легкой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29; б) переменный домен тяжелой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11; или с) переменный домен легкой цепи согласно а) и переменный домен тяжелой цепи согласно б).

Предпочтительные антигенсвязывающие белки из второго аспекта включают те, которые содержат переменный домен легкой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 27, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 9; те, которые содержат переменный домен легкой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 28, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 10; и те, которые содержат переменный домен легкой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 29, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 11.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие переменный домен тяжелой цепи, обладающий

определенной выше степенью родства с SEQ ID NO: 9, могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 9. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи, необязательно, содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий определенной выше степенью родства с SEQ ID NO: 10, могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 10. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи, необязательно, содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54.

В третьем аспекте антигенсвязывающий белок к OSMR содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий а) LCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 30; LCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 33; и LCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 36; б) LCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 31; LCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 34; и LCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 37; или в) LCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 32; LCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 35; и LCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью LCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 38; и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий д) HCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 12; HCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 15; и HCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 18; е) HCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 13; HCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 16; и HCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 19; или ф) HCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 14; HCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 17; и HCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 20.

Предпочтительные антигенсвязывающие белки к OSMR из третьего аспекта включают те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно а) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно д); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно б) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно е); и те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно с) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно ф).

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие вариабельный домен легкой цепи согласно а) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно д), могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 9. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи, необязательно, содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие вариабельный домен легкой цепи согласно б) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно е), могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 10. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи необязательно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54.

В четвертом аспекте изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR из первого, второго или третьего аспекта связывается с человеческим OSMR с аффинностью, меньшей или равной 1×10^{-10} М.

В пятом аспекте изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR из первого, второго, третьего или четвертого аспекта ингибирует связывание человеческого OSM с человеческим OSMR и/или человеческого IL-31 с человеческим OSMR.

В шестом аспекте изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR из первого, второго, третьего, четвертого или пятого аспекта снижает опосредуемый человеческим OSM и/или человеческим IL-31

сигналинг OSMR в человеческих клетках, экспрессирующих OSMR.

В седьмом аспекте изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR из шестого аспекта снижает опосредуемый OSM и/или IL-31 яванского макака сигналинг OSMR в клетках яванского макака, экспрессирующих OSMR.

В восьмом аспекте изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR из первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого или седьмого аспекта представляет собой антитело, такое как человеческое антитело. Предпочтительные антитела включают те антитела, которые содержат легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; те, которые содержат легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7; и те, которые содержат легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

Дополнительные антитела включают те антитела, которые содержат легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50; те, которые содержат легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51; и те, которые содержат легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52.

В девятом аспекте в изобретении предложены способы лечения аутоиммунного нарушения, воспалительного нарушения или нарушения, связанного с накоплением или перестройкой внеклеточного матрикса, при этом указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка к OSMR из любого из первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого или восьмого аспектов нуждающемуся в этом пациенту. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 27, и аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 9 (например, Ab1), антитело, содержащее аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 10 (например, Ab2), или антитело, содержащее аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 29, и аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 11 (например, Ab3). В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 27, и аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 53, или антитело, содержащее аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 54. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR ингибирует связывание OSM с OSMR или IL-31 с OSMR. В особенно предпочтительных вариантах реализации изобретения аутоиммунное нарушение, воспалительное нарушение или нарушение, связанное с накоплением или перестройкой внеклеточного матрикса, представляет собой фиброз, разрушение хрящевой ткани, артрит, ревматоидный артрит, склеродермию, ассоциированное со склеродермией интерстициальное заболевание легких, идиопатический легочный фиброз, цирроз, псориаз, атопический дерматит, системный кожный амилоидоз, первичный кожный амилоидоз, воспаление, зудящее воспаление, узловатую почесуху и боль.

Подробное описание изобретения

Приведенные в данном документе названия разделов используются исключительно в целях структурирования и не должны восприниматься как такие, которые ограничивают описываемый предмет изобретения. Все ссылки, приведенные в тексте данного описания, в полном объеме включены посредством ссылки.

Для получения рекомбинантных ДНК, синтеза олигонуклеотидов, тканевого культивирования и трансформации, очистки белков и т.д. можно использовать стандартные методы. Ферментативные реакции и очистку можно проводить в соответствии с указаниями производителя или так, как это традиционно принято в данной области техники или как описано в данном документе. Следующие процедуры и методы в общем случае можно осуществлять в соответствии с традиционными методами, хорошо известными в данной области техники и описанными во многих общих и более специализированных ссылках, приведенных и обсуждаемых в данном описании. См., например, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая включена в данный документ посредством ссылки для применения в любых целях. Хотя в тексте приведены специальные определения, номенклатура, используемая в связи с и лабораторные процедуры

и методы аналитической химии, органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, приготовления составов и доставки и лечения пациентов можно использовать стандартные методы.

OSMR.

Описанные в данном документе антигенсвязывающие белки связываются с OSMR. Передача сигнала OSM и IL-31 происходит через OSMR. OSMR является представителем семейства рецепторов цитокинов типа I. OSMR гетеродимеризуется с гликопротеином 130 (также известным как gp130, переносчик сигнала интерлейкина 6 (IL6ST), IL6-бета или CD130) с образованием OSMR типа II. OSMR также гетеродимеризуется с рецептором А IL-31 (IL31RA) с образованием рецептора IL-31 и, таким образом, осуществляет перенос OSM- и IL-31-индуцированных сигналов. В типовых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR связывает OSMR и предотвращает OSM- и/или IL-31-опосредуемый сигналинг в клетках, экспрессирующих OSMR.

Последовательности человеческого OSMR известны в данной области техники. В разных аспектах белковые последовательности человеческого OSMR приведены в GenBank под номерами доступа AAI25210, AAI25211, NP_003990 и EAW55976. Типовая аминокислотная последовательность человеческого OSMR (SEQ ID NO: 1) приведена в табл. 1. Белок состоит из нескольких доменов: аминокислоты 1-27 соответствуют сигнальной последовательности, которая может отщепляться во время процессинга белка в клетках млекопитающих; аминокислоты 28-740 соответствуют внеклеточному домену; а аминокислоты 741-761 соответствуют трансмембранному домену. В предпочтительных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антигенсвязывающие белки связываются с внеклеточным доменом OSMR и предотвращают взаимодействие OSM и/или IL-31 с OSMR.

Последовательности человеческого OSM известны в данной области техники. В разных аспектах белковые последовательности человеческого OSM приведены в GenBank под номерами доступа CAG30420, C7AG46504, NP_065391, P13725, AAC05173, EAW59864 и AAI11589. Типовая аминокислотная последовательность человеческого OSM (SEQ ID NO: 39) приведена в табл. 1. Аминокислоты 1-25 соответствуют сигнальной последовательности; аминокислоты 26-220 соответствуют зрелому белку; а аминокислоты 221-252 соответствуют пропептидной последовательности.

Последовательности человеческого IL-31 известны в данной области техники. В разных аспектах белковые последовательности человеческого IL-31 приведены в GenBank под номерами доступа NP_001014358, AAS86448, AAI32999, AAI33001, Q6EBC2 и EAW98310. Типовая аминокислотная последовательность человеческого IL-31 (SEQ ID NO: 41) приведена в табл. 1. Аминокислоты 1-23 соответствуют предполагаемой сигнальной последовательности.

Последовательности человеческого IL31RA известны в данной области техники. В разных аспектах белковые последовательности человеческого IL31RA приведены в GenBank под номерами доступа AAS86447, NP_001229567 и CBL94051. Типовая аминокислотная последовательность человеческого IL31RA (v4, изоформа 3) (SEQ ID NO: 43) приведена в табл. 1. Аминокислоты 1-32 соответствуют сигнальной последовательности; а аминокислоты 533-553 соответствуют трансмембранной последовательности.

Последовательности человеческого gp130 известны в данной области техники. В разных аспектах белковые последовательности человеческого gp130 приведены в GenBank под номерами доступа AAI17403, AAI17405, EAW54936, NP_002175, ABK41905 и AAA59155. Типовая аминокислотная последовательность человеческого gp130 (SEQ ID NO: 45) приведена в табл. 1. Белок состоит из нескольких доменов: аминокислоты 1-22 соответствуют сигнальной последовательности; аминокислоты 23-619 соответствуют внеклеточному домену; аминокислоты 620-641 соответствуют трансмембранному домену; а аминокислоты 642-918 соответствуют цитоплазматическому домену.

Таблица 1

<p>Аминокислотная последовательность человеческого OSMR (SEQ ID №: 1)</p> <p>MALFAVFTTFFLTLLSLRITYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSTRQSLHLQWTVHNLPHYHQEL KMFVQIQISRIETSNVIWVGNYSTTVKWNQVLHWSWESELPLECATHFVRIKSLVDDAKFPEP NFWSNWSSWEEVSVQDSTGQDILFVFPKDKLVEECTNVTICYVSRNIQNNVSCYLEGKQIHGE QLDPHVTA FNLSVPPFIRNKGTNIYCEASQGNVSEGMKGIVL FVSKVLEEPKDFSCETEDFKT LHCTWDPGDTALGWSKQPSQSYTLFESFSGEKKLCTHKNWCNWOITQDSQETYNFTLIAENY LRKRSVNILFNLT HRVYLMNPFVNFENVNATNAIMTKVHSIRNNFTYLCQIELHGEGKMMQ YNVSIKVNGEYFLSELEPATEYMARVRCADASHFWKSEWSGQNF TLEAAPSEAPDVWRIVS LEPGNHTVTLFWKPLSKLHANGKILFYNNVVENLDKPSSELSHSIPAPANSTKLILDRCSYQI CVIANNSV GASPASVIVISADPENKEVEEER IAGTEGGFSLSWKPQPGDVI GYVVDWC DHTQD VLGDFQWKNVGPNTTSTVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIAC LLEKKTGYSQELAPSDNPH VLVDTLTSHSFTLSWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFEKAVLS DGECCCKYKIDN PEKALIVDNLKPESFYEFITPFTSAGEGPSATFTKV TTPDEHSSMLIHI LLPMVFCVLLIM VMCYLSQWIKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKENPHLIIMNVSDCIPDAIEVVSKEPGTKIQ FLGTRKSLTETELTKPNYLYLPTKXNSHSGPGFCICFENLTYNQ AASDSGSCGHVPVSPKAPS MLGLMTPENVLKALEKNYMNSLGEIPAGETSLNYVSQLASPMFGDKDSLPTNPVEAPHCSZY KMQMAVSLRLALPPPTENSSLSITLLDPGEHYC</p>
<p>Аминокислотная последовательность человеческого OSM (SEQ ID №: 39)</p> <p>MGVLLIQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYIRIQ GLDVPKLRHCRERPGAFPSEETLRGLGRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERS GLNIEDLEKLMARPNI LGLRNNIYMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKL EGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRT RPSRKGKRLMTRGQLPR</p>
<p>Аминокислотная последовательность человеческого IL-31 (SEQ ID №: 41)</p> <p>MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKDV EEEKGVL VSQNYTLPCLSFDAQPNNIHSFAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEIIEHLDKLIFQDAPE TNISV PTDTHECKRFILTISSQQFSECMDLALKSLTSGAQQATT</p>
<p>Аминокислотная последовательность человеческого IL31RA (SEQ ID №: 43)</p> <p>MKLSQPSCVNLGMMWTWALWMLPSLCKFSLAALPAKPENISCVYYRKNLTCTWSPGKETS Y TQYTVKRTYAFGEKHDNCTTNSSTSEN RASC SF FLPRITIPDNYTIEVEAENG DGVIKSHMTY WRLENI AKTEPPKIFRVKPVLGKRMIQIEWIKPELAPVSSDLKYTLRFRTVNSTSWMEVNFA KNRKDKNQTYNLTGLQPFTEYVIALRC AVKESKFWS DWSQEKMGMT EEEAPCGLELWRV LKPA EADGRRPVRLWKKARGAPVLEKTLGYNIWYYPESNTNLTETMNTTNQQLHLHGGE SFVWSM ISYNSLGKSPVATLRIPAIQEKS FQCI EVMQACVAEDQLVVKWQSSALDVNTWMI EWFPD VDS EPTTLSWESVSQATNWTIQQDKLKPFWCYNISVY PMLHDKVGE PYSIQAYAKEGVPSEGPETK VENIGVKTVTITWKEIPKSERKGIICNYTIFYQAE GKGFSKTVNSSILQYGL ESLKRKTSYI VQVMAS TSAGGTNGTSINFKTL SFSVFEIILITSLIGGGLLILILTVA YGLKPKNKLTHLCW PTPVNP AESSIATWHGD DFKDKLNLKESDDSVNTE DRILKPCSTP SDKLVIDKLVVNF GNVLQ EIFTDEARTQENNLGGEKNGTRILSSCPTSI</p>

```

Аминокислотная последовательность человеческого gp130 (SEQ ID
№: 45)
MLTLQTLVQLFIFLTTTESTGELLDPGGYISPEPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNAN
YIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFFGQLEQNVYGITIIISGLPP
EKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTV
YFVNIIEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLVSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSV
IILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSE
EASGITYEDRPSKAPSFYWKIDPSHTQGYRTVQLVWKTLPPEFANGKILDYEVTLTRWKSHLQ
NYTVNATKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHFVMDLKAFFKDNMLWV
EWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGP
GSPESIKAYLKQAPPSKGPVTRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA
VNVDSSTHEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTPKFAQGEIEAIVVPCLAFL
LTTLLGLVLCFNKRDLIKKHIWPNVDPKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDKMYSDSNFTDVSV
VEIVANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSSSSDENESSQNTSST
VQYSTVVHSGYRHOVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGCGDILPRQQYFKQNC
SQHESPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTE
GQVERFETVGM EAATDEGMPKSYLPQIVRQGGYMPQ

```

В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения описанные в данном документе антигенсвязывающие белки связывают OSMR как человека, так и яванского макака с высокой аффинностью, включая те, которые связывают с высокой аффинностью и блокируют взаимодействие OSM и/или IL-31 яванского макака с OSMR яванского макака. Эти характеристики позволяют проводить информативные исследования на обезьянах.

Белковая последовательность OSMR макака-резуса (*Macaca mulatta*) известна в данной области техники и приведена в GenBank под номером доступа XP_001083745. Типовая аминокислотная последовательность OSMR яванского макака (*Macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 2) приведена в табл. 2. Белок состоит из нескольких доменов: аминокислоты 1-27 соответствуют сигнальной последовательности, которая может отщепляться во время процессинга белка в клетках млекопитающих; аминокислоты 28-737 соответствуют внеклеточному домену; а аминокислоты 738-757 соответствуют трансмембранному домену. В предпочтительных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе антигенсвязывающие белки связываются с внеклеточным доменом OSMR и предотвращают взаимодействие OSM и/или IL-31 с OSMR.

Белковая последовательность OSM макака-резуса (*Macaca mulatta*) известна в данной области техники и приведена в GenBank под номером доступа NP_001181403. Типовая аминокислотная последовательность OSM яванского макака (*Macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 40) приведена в табл. 2. Аминокислоты 1-196 соответствуют зрелому OSM яванского макака.

Белковая последовательность IL-31 макака-резуса (*Macaca mulatta*) известна в данной области техники и приведена в GenBank под номером доступа XP_001096743. Типовая аминокислотная последовательность IL-31 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 42) приведена в табл. 2. Эта последовательность представляет зрелый IL-31 яванского макака.

Типовая аминокислотная последовательность IL31RA яванского макака (*Macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 44) приведена в табл. 2. Аминокислоты 1-19 соответствуют сигнальной последовательности; а аминокислоты 520-540 соответствуют трансмембранному домену.

Белковая последовательность gp130 макака-резуса (*Macaca mulatta*) известна в данной области техники и приведена в GenBank под номером доступа NP_001252920. Типовая аминокислотная последовательность gp130 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 46) приведена в табл. 2. Белок состоит из нескольких доменов: аминокислоты 1-22 соответствуют сигнальной последовательности; аминокислоты 23-619 соответствуют внеклеточному домену; аминокислоты 620-641 соответствуют трансмембранному домену; а аминокислоты 642-918 соответствуют цитоплазматическому домену.

Таблица 2

```

Аминокислотная последовательность OSMR яванского макака (SEQ ID
№: 2)
MALFVVFQTTFFLILLSLRITYQSEVLAERLPLTPVSLKVVSTNSIHQSLHLQWTVHNLPHYQEL
KMFVFIQISRIETSNVWVGNYSTPVKWNQVLHWSWESELPLECATHEVRIKSVIDDASFPEP
NFWSNWSSWEEVSVQDYLRGTLFVFPKDKLVEEGSNVTICYVSRNIQNNVSCYLEGKQIHGE

```

<p>QLDPHVTAFLNLSVFFIRNRGTNIYCEASQGNVSKGIEGIVLFFVSKVLEEPKDFSCESQDFKC LHCTWDPGDTALGWSKQPSQSYTLFESFSGEKKLCTHKNWCNWQITQDSQEMYNFTLIAENY LRKRSVNIILFNLTHRVYLMNPFVNFENVNATNAIMTWKVHSMRNNFTYLCQIELIHGEGKMMQ YDVSINVNGEYFLSELEPATEYMARVRCADASHFWKWTEWSGQNFTTLEAAPSEAPDVWRSVN SEPGNHTVTLEFWKPLSKLHANGKILFYNVVVENLDKPSRSELSRIPAPANSTKLILDRCYSQZ CVTANNVSGASPASIIIVISADPENKEVEEERTAGTEGGFSLSWKPQPGDVIYVVWDWCIIIPQD VLQWKNVGPNTTSTVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACLEKKTGYSQELAPSDNPHVLV DMLTSHSFTLSWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFQKAVLSDGSECCRYKIDNPEE KALIVDNLKPESFYEFFVTPFTSAGEGPNATFTKVTTPDEHSMLIRIILPMVFCVLLIMIVC YLKSQWIKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKENPHLTIMNVSDCIPDAIEVVSKEPGTKIQLLG TRKSLTETELTKPNYLYLLPTEKNHSGPGPCICFENFTYNQAASDAGSCGHVPVPPKAPPSML GLMTSPENVLKALEKNYMSLGEVPAGETSLNYVSQLASPMGDKDSLPTNPVEPPHCSEYKM QMAVPLRLALPPPTENSSLSSITLLDPGEHYR</p>
<p>Аминокислотная последовательность OSM яванского макака (SEQ ID №:40) AAMGSCSKEYRMLLGLQKQTDLMQDTSRLLDPIYIRIQGLDIPKLEHCRESPGAFPSSEETLR GLGRRGLQTLNATLGRILHRLADLEQHLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNVGLRNNVY CMAQLLDNSDMTEPTKAGRGTQPPTPTSDVFORKLEGCFLRGYHRFMHVSGRVFSKWGE SPNRSRR</p>
<p>Аминокислотная последовательность IL-31 яванского макака (SEQ ID №:42) TLPVHFLQPSDIQKIVEELQSLSKMLLKDVKEDKGVLVSONYTLPCLTQPPNIIHSPAIR AYLKTIRQLDNKSVIDEIIEHLDKLIQDAPETNISVPTDTHECKRFILITISQQFSECMDLAL KSLTSGAQQAIT</p>
<p>Аминокислотная последовательность IL31RA яванского макака (SEQ ID №:44) MMWTWALWMPFLCKFGLAALPAKPENISCVYYRKNLTCTWSPGKETSQYQYAKRITYAFGK KHDNCTSSSTSENRASCSFFLPRITIPDNYTIEVEAENGDVIKSDMTCWRLEDIAKTEPPE IFSVPVGLGKRMIRIEWIKPELAPVSSDLKYALRFRTVNSTSWMEVNFANRDKDTNQTYNLM GLQAFTEYVVALRCAVKESKFWSQEKMGTEEEAPCGLELWRVLPTEVDGRRPVRLWLK KARGAPVLEKTLGYNIWYFPENNTNLTEVTNTNQQLLEHLGGESYWVSMISYNSLKGSPVT LRIPAIQEKSFRCIEVMQACLAEDQLVVKWQSSALDVNTWMIEWFPDMSEHPTLSWESVSA TNWTIQQDKLKFWCYNISVYPMLHDKVGEPYSIQAYAKEGIPSKGPETKVENIGVKTVTITW KEIPKSERKGIICNYTIFYQAEAGGTGFSKTVNSSILQYGLESIKRKTSTYTVRMASTAGGIN GTSINFKTLSPSVFEIILITSLIGGLLILILTVAYGLKKNKLTHLCWPSVNPNAESSIAC</p>

WRGDDFKDKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPSPDKLVIDKSVVNFVGLQEMFTDEARTQGEN NLGGEKNENRILSSCPTS I
Аминокислотная последовательность gp130 яванского макака (SEQ ID №: 46)
MLTLQTWVQALFIFLTTESIGELLDPGQYISPEPQVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNAN YIVWKTNHFITIPKEQYTIINRTASSVTFTDISSLNIQLTCNIIITFGQLEQNVYGITIISGLPP EKPKNLSCIVNEGKKMRCEWNRGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCQTVDYSTV YFVNIIEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPKP?HNLSVINSEELSSILKLTWTNPSISKSV IRLKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRICCMKEDGKGYSDWSE EANGITYEDRPSKAPSFYKIDPSHAQGYRTVQLMWKTLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQ NYTVNDTKLTVNLTNDRYVATLTARNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHFPVMDLKAFFKDNMLWV EWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCIADWQQEDGTVHRTHLRGNLAESKCYLITVTPVYADGP GSPESIKAYLKQAPPSKGPVTRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA VNVDSSTHEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAF LTTLLGVLFENKRDLIKHIWPNVDPKSHIAQWSPHTPPRHNFSKDKMYSDGNFTDVS VEIEANDKKPPFEDLKSLLDFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPISSSDENESSQNTSS VQYSTVVHSGYRHHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGSDDILPRQQYFKQNC SQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGEMKMFQEVSAADPFPGT EQVERFETIGMEAAIDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ

Антигенсвязывающие белки к OSMR.

В настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие белки, которые специфически связывают OSMR. Варианты реализации антигенсвязывающих белков включают пептиды и/или полипептиды, которые специфически связывают OSMR. Такие пептиды или полипептиды могут необязательно содержать одну или более посттрансляционных модификаций. Варианты реализации антигенсвязывающих белков включают антители и их фрагменты, всесторонне определенные в данном документе, которые специфически связывают OSMR. Они включают антители, которые специфически связывают человеческий OSMR, включая те, которые ингибируют связывание и/или активацию OSMR OSM и/или IL-31.

Антигенсвязывающие белки согласно изобретению специфически связываются с OSMR. В контексте данного документа "специфически связывает" означает, что антигенсвязывающий белок предпочтительно связывает OSMR по сравнению с другими белками. В некоторых вариантах реализации изобретения "специфически связывает" означает, что антигенсвязывающий белок к OSMR обладает более высокой аффинностью к OSMR, чем к другим белкам. Антигенсвязывающие белки к OSMR, которые специфически связывают OSMR, могут иметь аффинность связывания в отношении человеческого OSMR, меньшую или равную 1×10^{-7} М, меньшую или равную 2×10^{-7} М, меньшую или равную 3×10^{-7} М, меньшую или равную 4×10^{-7} М, меньшую или равную 5×10^{-7} М, меньшую или равную 6×10^{-7} М, меньшую или равную 7×10^{-7} М, меньшую или равную 8×10^{-7} М, меньшую или равную 9×10^{-7} М, меньшую или равную 1×10^{-8} М, меньшую или равную 2×10^{-8} М, меньшую или равную 3×10^{-8} М, меньшую или равную 4×10^{-8} М, меньшую или равную 5×10^{-8} М, меньшую или равную 6×10^{-8} М, меньшую или равную 7×10^{-8} М, меньшую или равную 8×10^{-8} М, меньшую или равную 9×10^{-8} М, меньшую или равную 1×10^{-9} М, меньшую или равную 2×10^{-9} М, меньшую или равную 3×10^{-9} М, меньшую или равную 4×10^{-9} М, меньшую или равную 5×10^{-9} М, меньшую или равную 6×10^{-9} М, меньшую или равную 7×10^{-9} М, меньшую или равную 8×10^{-9} М, меньшую или равную 9×10^{-9} М, меньшую или равную 1×10^{-10} М, меньшую или равную 2×10^{-10} М, меньшую или равную 3×10^{-10} М, меньшую или равную 4×10^{-10} М, меньшую или равную 5×10^{-10} М, меньшую или равную 6×10^{-10} М, меньшую или равную 7×10^{-10} М, меньшую или равную 8×10^{-10} М, меньшую или равную 9×10^{-10} М, меньшую или равную 1×10^{-11} М, меньшую или равную 2×10^{-11} М, меньшую или равную 3×10^{-11} М, меньшую или равную 4×10^{-11} М, меньшую или равную 5×10^{-11} М, меньшую или равную 6×10^{-11} М, меньшую или равную 7×10^{-11} М, меньшую или равную 8×10^{-11} М, меньшую или равную 9×10^{-11} М, меньшую или равную 1×10^{-12} М, меньшую или равную 2×10^{-12} М, меньшую или равную 3×10^{-12} М, меньшую или равную 4×10^{-12} М, меньшую или равную 5×10^{-12} М, меньшую или равную 6×10^{-12} М, меньшую или равную 7×10^{-12} М, меньшую или равную 8×10^{-12} М или меньшую или равную 9×10^{-12} М.

Методы измерения аффинности связывания антигенсвязывающего белка хорошо известны в данной области техники. Методы, которые обычно используются для определения аффинности, включают поверхностный плазмонный резонанс (ППР) (Morton and Myszka "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors", Methods in Enzymology (1998), 295, 268-294), биослоевую интерферометрию (Abdiche et al. "Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet", Analytical Biochemistry (2008), 377, 209-217), анализ

кинетического исключения (KinExA) (Darling and Brault "Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions", *Assay and Drug Dev. Tech.* (2004), 2, 647-657), изотермическую калориметрию (Pierce et al. "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions", *Methods* (1999), 19, 213-221) и аналитическое ультрацентрифугирование (Lebowitz et al. "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review", *Protein Science* (2002), 11:2067-2079). В примере 5 приведены типовые методы определения аффинности.

Следует понимать, что в рамках данного документа отнесение к разным вариантам реализации OSMR-связывающих антител, также включает их OSMR-связывающие фрагменты. OSMR-связывающий фрагмент содержит любые фрагменты или домены антител, описанных в данном документе, которые сохраняют способность специфически связываться с OSMR. OSMR-связывающий фрагмент может находиться в любом из описанных в данном документе каркасов.

В определенных терапевтических вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR ингибирует связывание OSM и/или IL-31 с OSMR и/или ингибирует один или более видов биологической активности, связанной со связыванием OSM и/или IL-31 с OSMR, например OSM- и/или IL-31-опосредуемый сигналинг. Говорят, что такие антигенсвязывающие белки являются "нейтрализующими". В определенных вариантах реализации изобретения нейтрализующий антигенсвязывающий белок к OSMR специфически связывает OSMR и ингибирует связывание OSM и/или IL-31 с OSMR приблизительно на 10-100%, например по меньшей мере на около 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, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более. Например, антигенсвязывающие белки к OSMR можно исследовать в отношении нейтрализующей способности, определяя способность антигенсвязывающего белка блокировать связывание OSM и/или IL-31 с OSMR, см., например, анализ блокирования OSMR человека и OSMR и яванского макака из примеров 2 и 3 соответственно. В альтернативном варианте антигенсвязывающие белки к OSMR можно исследовать в отношении нейтрализующей способности методом, в котором определяют влияние присутствия антигенсвязывающего белка к OSMR в анализе, определяющем OSM- и/или IL-31-опосредуемую биологическую функцию, например способность OSM индуцировать биологический ответ, такой как стимуляция активности активатора плазминогена в культивируемых бычьих эндотелиальных клетках аорты, регуляция экспрессии IL-6 в эндотелиальных клетках человека и стимуляция ЛПНП-захвата и повышающая регуляция ЛПНП-рецепторов клеточной поверхности в клетках HepG2, в альтернативном варианте способность IL-31 индуцировать воспаление в кожных тканях.

Варианты реализации антигенсвязывающих белков включают каркасную структуру, всесторонне определенную в данном документе, с одной или более определяющими комплементарность областями (CDR). Варианты реализации дополнительно включают антигенсвязывающие белки, содержащие каркасную структуру с одним или более вариabельными доменами антитела, как тяжелыми, так и легкими. Варианты реализации включают антитела, которые содержат вариabельный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из вариabельного домена легкой цепи Ab1 (LCv), Ab2 LCv и Ab3 LCv (SEQ ID NO: 27-29 соответственно), и/или вариabельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из вариabельного домена тяжелой цепи Ab1 (HCv), Ab2 HCv и Ab3 HCv (SEQ ID NO: 9-11 соответственно), а также их фрагменты, производные мутеины и варианты.

Типовой вариант вариabельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 содержит аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 9. Аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 53, представляет собой пример варианта вариabельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 9.

Типовой вариант вариabельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 10 содержит аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 54, представляет собой пример варианта вариabельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 10.

Типовая легкая цепь, содержащая Ab1 LCv, представляет собой легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24.

Типовая легкая цепь, содержащая Ab2 LCv, представляет собой легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25.

Типовая легкая цепь, содержащая Ab3 LCv, представляет собой легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26.

Типовая тяжелая цепь, содержащая Ab1 HCv, представляет собой тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6.

Типовая тяжелая цепь, содержащая вариант Ab1 HCv, представляет собой тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50.

Типовая тяжелая цепь, содержащая Ab2 HCv, представляет собой тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

Типовая тяжелая цепь, содержащая вариант Ab2 HCv, представляет собой тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51.

Типовая тяжелая цепь, содержащая Ab3 HCv, представляет собой тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

Типовая тяжелая цепь, содержащая вариант Ab3 HCv, представляет собой тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52.

Дополнительны примеры рассматриваемых каркасов включают, но не ограничиваются этим, фибронектин, неокарциностагин CBM4-2, липокалины, рецептор Т-клеток, домен протеина А (протеин Z), Im9, белки TPR, цинкпальцевые домены, рVIII, птичий панкреатический полипептид, GCN4, домен WW, домен Src-гомологии 3, домены PDZ, бета-лактамазу TEM-1, тиоредоксин, стафилококковую нуклеазу, PHD-пальцевые домены, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, экотин, LACI-D1, LDTI, MTI-II, скорпионьи токсины, пептид дефензин-А насекомых, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, цитохром b-562, домены ЛПНП-рецепторов, гамма-кристаллин, убиквитин, трансферрин и/или лектин-подобные домены С-типа. Обзор каркасов, не относящихся к антителам, и их применения в качестве терапевтических средств приведен в Gebauer and Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255 (2009) и Binz et al., *Nat. Biotech.*, 23(10):1257-68 (2005), которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Аспекты изобретения включают антитела, содержащие следующие переменные домены: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO: 28/SEQ ID NO: 10), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 11) и их комбинации, а также их фрагменты, производные, мутеины и варианты.

Также включены антитела, содержащие следующие переменные домены: SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 28/SEQ ID NO: 54.

Типовые антитела согласно изобретению включают Ab1 (SEQ ID NO: 24/SEQ ID NO: 6), Ab2 (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 7) и Ab3 (SEQ ID NO: 26/SEQ ID NO: 8).

Дополнительные типовые антитела включают SEQ ID NO: 24/SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 26/SEQ ID NO: 52.

Как правило, каждый переменный домен легкой или тяжелой цепи антитела содержит три CDR. Переменный домен тяжелой цепи содержит CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи и CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи. Переменный домен легкой цепи содержит CDR1 (LCDR1) легкой цепи, CDR2 (LCDR2) легкой цепи и CDR3 (LCDR3) легкой цепи. В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит одну или более CDR, находящихся в предпочтительных переменных доменах, описанных в данном документе.

Примеры таких CDR включают, но не ограничиваются этим:

CDR, принадлежащие Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 30), LCDR2 (SEQ ID NO: 33) и LCDR3 (SEQ ID NO: 36);

CDR, принадлежащие Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 31), LCDR2 (SEQ ID NO: 34) и LCDR3 (SEQ ID NO: 37);

CDR, принадлежащие Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 32), LCDR2 (SEQ ID NO: 35) и LCDR3 (SEQ ID NO: 38);

CDR, принадлежащие Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 12), HCDR2 (SEQ ID NO: 15) и HCDR3 (SEQ ID NO: 18);

CDR, принадлежащие Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 13), HCDR2 (SEQ ID NO: 16) и HCDR3 (SEQ ID NO: 19); и

CDR, принадлежащие Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 14), HCDR2 (SEQ ID NO: 17) и HCDR3 (SEQ ID NO: 20).

В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит:

А) полипептид, например легкую цепь, который содержит LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 31 и 32; LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34 и 35; и/или LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 37 и 38; и/или

В) полипептид, например тяжелую цепь, который содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13 и 14; HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16 и 17; и/или HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 19 и 20.

В дополнительных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит:

А) аминокислотную последовательность легкой цепи, которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из любого из Ab1 LCv, Ab2 LCv и Ab3 LCv; и

В) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из любого из Ab1 HCv, Ab2 HCv и Ab3 HCv.

В определенных вариантах реализации изобретения CDR содержит не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с типовой CDR, приведенной в данном документе.

Аспекты изобретения включают антитела, содержащие переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 29. Аспекты изобретения включают антитела, содержащие переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10 и 11. Дополнительные аспекты изобретения включают антитела, содержащие А) переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 29, и В) переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

Антитела согласно изобретению могут содержать любую известную в данной области техники константную область. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например человеческую константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например человеческую константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа. В одном варианте реализации изобретения константная область легкой или тяжелой цепи представляет собой фрагмент, производное, вариант или мутант константной области природного происхождения.

Аспекты изобретения включают антитела, содержащие переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 29, содержащую не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных добавок, делеций или замен. Аспекты изобретения включают антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10 и 11, содержащую не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных добавок, делеций или замен.

Дополнительные аспекты изобретения включают антитела, содержащие:

А) переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 29, содержащую не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных добавок, делеций или замен; и

В) переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10 и 11, содержащую не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных добавок, делеций или замен.

В одной вариации антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 29.

В другой вариации антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

В дополнительном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит:

А) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 29; и

В) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последова-

тельности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий определенной выше степенью родства с последовательностью SEQ ID NO: 9, могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 9. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи необязательно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий определенной выше степенью родства с последовательностью SEQ ID NO: 10, могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 10. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи необязательно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54.

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит CDR3 легкой цепи и/или тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 36, 37, 38, 18, 19 и 20. В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность содержит не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с типовой последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 36, 37, 38, 18, 19 и 20.

Таким образом, варианты реализации изобретения включают антигенсвязывающий белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 36, 37, 38, 18, 19 и 20.

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит CDR2 легкой цепи и/или тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 33, 34, 35, 15, 16 и 17. В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность содержит не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с типовой последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 33, 34, 35, 15, 16 и 17.

Таким образом, варианты реализации изобретения включают антигенсвязывающий белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 33, 34, 35, 15, 16 и 17.

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит CDR1 легкой цепи и/или тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 30, 31, 32, 12, 13 и 14. В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность содержит не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с типовой последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 30, 31, 32, 12, 13 и 14.

Таким образом, варианты реализации изобретения включают антигенсвязывающий белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 30, 31, 32, 12, 13 и 14.

Антигенсвязывающие белки согласно изобретению содержат каркасы традиционных антител, включая человеческие и моноклональные антитела, биспецифические антитела, диатела, мини-тела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе "миметиками анти-

тел"), химерные антитела, слитые антитела (иногда называемые в данном документе "конъюгатами антител") и фрагменты каждого из них, соответственно. Вышеописанные CDR, включая разные комбинации CDR, могут быть привиты в любой из следующих каркасов.

Употребляемый в данном документе термин "антитело" относится к разным формам мономерных или мультимерных белков, содержащих одну или более полипептидных цепей, которые специфически связываются с антигеном, как всесторонне определено в данном документе. В определенных вариантах реализации изобретения антитела получают при помощи технологии рекомбинантных ДНК. В дополнительных вариантах реализации изобретения антитела получают при помощи ферментативного или химического расщепления антител природного происхождения. В другом аспекте антитело выбрано из группы, состоящей из а) человеческого антитела; б) гуманизированного антитела; в) химерного антитела; г) моноклонального антитела; д) поликлонального антитела; е) рекомбинантного антитела; ж) антигенсвязывающего фрагмента; з) одноцепочечного антитела; и) диатела; я) триатела, к) тетратела, л) фрагмента Fab; м) фрагмента F(ab')₂, н) IgA антитела, о) IgD антитела, п) IgE антитела, q) IgG1 антитела, r) IgG2 антитела, s) IgG3 антитела, t) IgG4 антитела и u) IgM антитела.

Вариабельная область или домен содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи, встроенные в каркасную область (обозначения каркасных областей следующие: FR1, FR2, FR3 и FR4). Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Традиционные структурные единицы антител, как правило, содержат тетрамер. Каждый тетрамер, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом в каждой паре содержится одна "легкая" и одна "тяжелая" цепь. Аминотерминальная часть каждой цепи содержит вариабельную область из от около 100 до 110 или более аминокислот, ответственную, главным образом, за распознавание антигена. Карбокситерминальная часть каждой цепи определяет константную область, ответственную, главным образом, за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда легкие цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, что определяет изотип антитела - IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая, но не ограничиваясь этим, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь этим, IgM1 IgM2. Варианты реализации изобретения включают все такие классы и подклассы антител, которые содержат вариабельный домен или CDR антигенсвязывающих белков, как описано в данном документе.

Некоторые антитела природного происхождения, такие как те, которые можно обнаружить у верблюдов и лам, представляют собой димеры, состоящие из двух тяжелых цепей, и не содержат легких цепей. В данное изобретение включены димерные антитела, состоящие из двух тяжелых цепей, или их фрагменты, которые способны связываться с OSMR.

Вариабельные области тяжелых и легких цепей, как правило, имеют одинаковую общую структуру в отношении консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, т.е. определяющими комплементарность областями или CDR. CDR отвечают, главным образом, за распознавание и связывание антигена. CDR из двух цепей каждой пары выровнены посредством каркасных областей, что делает возможным связывание со специфическим эпитопом. В направлении от N-конца к C-концу как легкая, так и тяжелая цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому из доменов проводится в соответствии с определениями Кабата.

CDR формируют основные участки контакта для связывания антигена. CDR3 легкой цепи и в особенности CDR3 тяжелой цепи могут формировать наиболее важные детерминанты связывания антигена в пределах вариабельных областей легкой и тяжелой цепей. В некоторых антителах CDR3 тяжелой цепи формирует основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы *in vitro* селекции, в которых варьируется только CDR3, можно использовать, чтобы варьировать связывающие свойства антитела для определения того, какие остатки имеют значение для связывания антигена.

Антитела природного происхождения, как правило, содержат сигнальную последовательность, которая направляет антитело в клеточный путь для секреции белка и которая обычно отсутствует в зрелом антителе. Полинуклеотид, кодирующий антитело согласно изобретению, может кодировать сигнальную последовательность природного происхождения или гетерологичную сигнальную последовательность, как описано ниже.

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее от одного до шести описанных в данном документе типовых CDR. Антитела согласно изобретению могут принадлежать любому типу, включая антитела IgM, IgG (включая IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA или IgE. В конкретном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок представляет собой антитело типа IgG, например, антитело IgG1.

В некоторых вариантах реализации изобретения, например в тех, в которых антигенсвязывающий белок представляет собой антитело с полными тяжелой и легкой цепями, все CDR принадлежат одному виду, например человеку. В альтернативном варианте, например в вариантах реализации изобретения, в которых антигенсвязывающий белок содержит менее шести CDR из приведенных выше последовательностей, дополнительные CDR могут принадлежать другому виду или могут представлять собой CDR,

отличные от тех, которые были проиллюстрированы в типовых последовательностях. Например, области HCDR3 и LCDR3, полученные из соответствующих определенных в данном документе последовательностей, можно использовать вместе с HCDR1, HCDR2, LCDR1 и LCDR2, необязательно выбранными из последовательностей другого вида или последовательностей других человеческих антител, или их комбинаций. Например, CDR согласно изобретению можно замещать области CDR соответствующих коммерческих химерных или гуманизированных антител.

В конкретных вариантах реализации изобретения применяют каркасные компоненты антигенсвязывающих белков, которые представляют собой человеческие компоненты. При этом в некоторых вариантах реализации изобретения каркасные компоненты могут представлять собой комбинацию, полученную от разных видов. Следовательно, если антигенсвязывающий белок является антителом, такое антитело может представлять собой химерное антитело и/или гуманизированное антитело. В общем случае как "химерные антитела", так и "гуманизированные антитела" относятся к антителам, содержащим области, полученные от более чем одного вида. Например, "химерные антитела" обычно содержат вариабельную(ые) область(ы) мыши (или в некоторых случаях крысы) и константную(ые) область(и) человека.

"Гуманизированные антитела" в общем случае относятся к нечеловеческим антителам, в которых каркасные области вариабельных доменов были заменены последовательностями, которые можно обнаружить в человеческих антителах. В общем случае гуманизированного антитела все антитело, за исключением одной или более CDR, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или идентично такому антителу, за исключением одной или более CDR. CDR, некоторые из которых или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами нечеловеческого происхождения, привиты в складчатый бета-слой каркаса вариабельной области человеческого антитела, чтобы получить антитело, специфичность которого определяется привитыми CDR. Получение таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones 1986, Nature, 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536. Гуманизированные антитела также можно получить, используя мышей с генетически сконструированной иммунной системой (Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654). В описанных в данном документе типовых вариантах реализации изобретения определенные CDR принадлежат человеку и, таким образом, как гуманизированные, так и химерные антитела в данном контексте содержат некоторые нечеловеческие CDR; например гуманизированные антитела могут быть получены таким образом, чтобы содержать области HCDR3 и LCDR3 с одной или более других CDR-областей, принадлежащих отличному виду.

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой мультиспецифическое антитело, а именно - биспецифическое антитело, также называемое "диателом". Это такие антитела, которые связываются с двумя или более разными антигенами или разными эпитопами одного антигена. В определенных вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело связывает OSMR и антиген человеческой эффекторной клетки (например, T-клетки). Такие антитела удобны для нацеливания на ответ эффекторных клеток против экспрессирующих OSMR клеток, таких как экспрессирующая OSMR опухолевая клетка. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антигеном человеческой эффекторной клетки является CD3, патент США № 7235641. Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. Один из таких способов включает конструирование Fc-части тяжелых цепей, чтобы получить "выступы" и "впадины", которые способствуют образованию гетеродимеров тяжелых цепей в случае коэкспрессии в клетке, патент США № 7695963. Другой способ также включает конструирование Fc-части тяжелой цепи, но в нем используется электростатическое взаимодействие для стимуляции образования гетеродимеров, при этом подавляется образование гетеродимеров тяжелых цепей в случае коэкспрессии в клетке, WO 09/089004, которая в полном объеме включена в данный текст посредством ссылки.

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой минитело. Мини-тела представляют собой минимизированные антитело-подобные белки, содержащие scFv, соединенный с доменом CH3 (Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061).

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой доменное антитело; см., например, патент США № 6248516. Доменные антитела (dAbs) представляют собой функциональные связывающие домены антител, соответствующие вариабельным областям как тяжелой (V_H), так и легкой (V_L) цепей человеческих антител. dAbs имеют молекулярную массу приблизительно 13 кДа или составляют менее одной десятой от размера полного антитела. dAbs хорошо экспрессируются в разных организмах-хозяевах, включая бактериальные, дрожжевые и млекопитающие клеточные системы. Кроме того, dAbs очень стабильны и сохраняют активность даже после воздействия жестких условий, таких как лиофилизация или термическая денатурация. См., например, патенты США № 6291158; 6582915; 6593081; 6172197; США № 2004/0110941; Европейский патент 0368684; патенты США № 6696245, WO 04/058821, WO 04/003019 и WO 03/002609.

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой фрагмент антитела, т.е. фрагмент любого из приведенных в данном документе антител, который сохраняет специфичность связывания с OSMR. В разных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие белки содержат, без ограничений, фрагменты F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv или фрагменты одноцепочечного Fv. В контексте данного документа антитело содержит, как минимум, полипептид, который мо-

жет специфически связываться с OSMR и содержит всю или часть варибельной области легкой или тяжелой цепи, например одну или более CDR.

Дополнительные примеры OSMR-связывающих фрагментов антител включают, но не ограничиваются этим, (i) фрагмент Fab, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_H1 , (ii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_H1 , (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного антитела; (iv) фрагмент dAb (Ward et al., 1989, Nature, 341:544-546), который состоит из одной варибельной области, (v) выделенные CDR-области, (vi) фрагменты $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab, (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых домен V_H и домен V_L связаны пептидным линкером, который делает возможной ассоциацию двух доменов с образованием антигенсвязывающего участка (Bird et al., 1988, Science, 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) биспецифические димеры одноцепочечного Fv (PCT/US92/09965) и (ix) "диатела" или "триатела", мультивалентные или мультиспецифические фрагменты, сконструированные путем генного слияния (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO 94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448). Фрагменты антител могут быть модифицированы. Например, молекулы могут быть стабилизированы путем включения дисульфидных мостиков, связывающих домены V_H и V_L (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245). Аспекты изобретения включают варианты реализации, в которых не относящиеся к CDR компоненты этих фрагментов представляют собой человеческие последовательности.

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой полностью человеческое антитело. В этом варианте реализации изобретения, как указано выше, специфические структуры содержат полные тяжелые и легкие цепи, содержащие CDR-области. В дополнительных вариантах реализации изобретения применяют одну или более CDR согласно изобретению вместе с другими CDR, каркасными областями, J и D областями, константными областями и т.д., полученными из других человеческих антител. Например, CDR согласно изобретению могут замещать CDR любого количества человеческих антител, в частности соответствующих коммерческих антител.

Образование одноцепочечных антител может происходить путем связывания фрагментов варибельных доменов тяжелой и легкой цепи (Fv-областей) посредством аминокислотного мостика (короткого пептидного линкера), что приводит к образованию одной полипептидной цепи. Такие одноцепочечные Fv (scFv) получали путем слияния ДНК, кодирующей пептидный линкер, с ДНК, кодирующими два полипептида варибельных доменов (V_L и V_H). Полученные в результате полипептиды могут конъюгировать сами с собой или они могут образовывать мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры) в зависимости от длины гибкого линкера между двумя варибельными доменами (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Комбинируя полипептиды, содержащие разные V_L и V_H , можно получить мультимерные scFv, которые связываются с разными эпитопами (Kiangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Методы, разработанные для получения одноцепочечных антител, включают те, которые описаны в патенте США № 4946778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544; de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87. Одноцепочечные антитела, полученные из предложенных в данном документе антител, включая, но не ограничиваясь этим, scFv, содержащие комбинации варибельных доменов Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO: 28/SEQ ID NO: 10) и Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 11), а также их комбинации, включены в настоящее изобретение. Типовые одноцепочечные антитела содержат следующие комбинации варибельных доменов: SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 53; и SEQ ID NO: 28/SEQ ID NO: 54.

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой слитый белок антитела (иногда называемый "конъюгатом антитела"). Конъюгационный партнер может быть как белковым, так и небелковым; последний вариант получают, используя функциональные группы антигенсвязывающего белка и конъюгационного партнера. В определенных вариантах реализации изобретения антитело конъюгировано с небелковым химическим веществом (лекарственным препаратом), образуя конъюгат антитела и лекарственного препарата.

В одном варианте реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR представляет собой аналог антитела, иногда называемый "синтетическим антителом". Например, в большом количестве работ используют как альтернативные белковые каркасы, так и искусственные каркасы с привитыми CDR. Такие каркасы включают, но не ограничиваются этим, мутации, введенные для стабилизации трехмерной структуры связывающего белка, а также полностью синтетические каркасы, состоящие, например, из биосовместимых полимеров. См., например, Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. Кроме того, можно применять пептидные миметики антител ("ПАМ"), а также соединения на основе миметиков антител, в которых в качестве каркасов используются компоненты фибронектина.

В контексте данного документа под "белком" подразумеваются по меньшей мере две ковалентно соединенные аминокислоты, а данный термин включает белки, полипептиды, олигопептиды и пептиды. В некоторых вариантах реализации изобретения две или более ковалентно соединенные аминокислоты соединены пептидной связью. Белок может состоять из аминокислот природного происхождения и со-

держат пептидные связи, например, в случае, когда белок получен рекомбинантно с применением экспрессионных систем и клеток-хозяев, как описано ниже. В альтернативном варианте белок может содержать синтетические аминокислоты (например, гомофенилаланин, цитруллин, орнитин и норлейцин) или пептидомиметические структуры, т.е. "пептидные или белковые аналоги", такие как пептоиды (см., Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:9367, включенную в данный документ посредством ссылки), которые могут быть устойчивы к протеазам или другим физиологическим условиям и/или условиям хранения. В частности, такие синтетические аминокислоты могут быть включены во время синтеза антигенсвязывающего белка *in vitro* при помощи традиционных способов, хорошо известных в данной области техники. Кроме того, можно использовать любые комбинации пептидомиметиков, синтетических и природных остатков/структур. Термин "аминокислота" также включает аминокислотные остатки, такие как пролин и гидроксипролин. Аминокислотная "R-группа" или "боковая цепь" может находиться как в (L)-, так и в (S)-конфигурации. В конкретном варианте реализации изобретения аминокислоты находятся в (L)- или (S)-конфигурации.

В определенных аспектах в изобретении предложены рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые связывают OSMR и в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный человеческий OSMR или его часть. В этом контексте "рекомбинантный белок" представляет собой белок, полученный при помощи рекомбинантных технологий с применением любых известных в данной области техники способов и методов, т.е. путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. Методы и способы получения рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники. Варианты реализации изобретения включают рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые связывают OSMR дикого типа и его варианты.

"Состоящий преимущественно из" означает, что аминокислотная последовательность может отличаться примерно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15% от приведенной последовательности SEQ ID NO:, но при этом сохранять биологическую активность, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие белки согласно изобретению представляют собой выделенные белки или в значительной степени очищенные белки. "Выделенный" белок содержит по меньшей мере некоторое количество материала, с которым он обычно связан в своем естественном состоянии, например такой материал может составлять по меньшей мере около 5% или по меньшей мере около 50% по массе от общего количества белка в заданном образце. Следует понимать, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9% по массе от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Например, белок может быть получен в значительно более высокой концентрации посредством применения индуцибельного промотора или промотора высокой экспрессии, что приводит к выработке белка с повышенным уровнем концентрации. Данное определение включает получение антигенсвязывающего белка в большом количестве организмов и/или клеток-хозяев, которые известны в данной области техники.

В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют, применяя известные в данной области техники стандартные методы, включая, но не ограничиваясь этим, алгоритм локальной идентичности последовательностей Смита и Уотермана, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания идентичных последовательностей Нидлмана-Вунша, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метод поиска сходства Пирсона и Липмана, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, компьютеризованные варианты этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), программу для выравнивания последовательностей Best Fit, описанную в Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно с использованием параметров по умолчанию или по усмотрению. Предпочтительно процент идентичности рассчитывают при помощи FastDB на основании следующих параметров: штраф за несовпадение - 1; штраф за гэп -1; штраф за размер гэпа - 0,33; и штраф за соединение - 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, p. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером подходящего алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей, используя прогрессивное попарное выравнивание. Также можно построить дерево, показывающее группы взаимосвязей, используемые для создания выравнивания. В PILEUP используется упрощенный метод прогрессивного выравнивания Фенга и Дулиттла, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; этот метод сходный с тем, что был описан Хиггисом и Шарпом, 1989, CABIOS 5:151-153. Применяемые параметры PILEUP включают вес гэпа по умолчанию в 3,00, длину гэпа по умолчанию в 0,10 и гэпы со взвешенными концами.

Другим примером подходящего алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. В частности, подходящей программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена в соответствии с Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480. В WU-BLAST-2 используется несколько поисковых параметров, большинство из которых устанавливается по умолчанию. Для корректируемых параметров устанавливаются следующие значения: длина перекрытия = 1, доля перекрытия = 0,125, пороговая длина слова (T) = П. Па-

раметры HSP S и HSP S2 являются динамическими величинами и определяются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом указанные величины можно корректировать, чтобы повысить чувствительность.

Дополнительным подходящим алгоритмом является BLAST с гэпами, описанный в Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. В BLAST с гэпами используется матрица весовых оценок замен BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; метод двойного совпадения используется для инициации продлений без гэпов, затраты на длину гэта, равную k, составляют $10+k$; X_u установлен на 16, а X_g установлен на 40 на этапе поиска по базе данных и на 67 на выходном этапе алгоритмов. Выравнивание с гэпами иницируется при весе, соответствующем около 22 битам.

В общем случае аминокислотная гомология, сходство или идентичность между отдельными вариантами CDR и приведенной в данном документе последовательностью составляет по меньшей мере 80% и более часто предпочтительно имеет возрастающую степень гомологии или идентичности, составляющую по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и почти 100%. Аналогично, "процент (%) идентичности нуклеотидной последовательности" с определенной в данном документе нуклеотидной последовательностью связывающих белков определяется как процентное содержание нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с нуклеотидными остатками кодирующей последовательности антигенсвязывающего белка. В конкретном способе используется BLASTN-модуль WU-BLAST-2 с установленными по умолчанию параметрами и длиной перекрытия и долей перекрытия установленными на 1 и 0,125 соответственно.

В общем случае гомология, сходство или идентичность нуклеотидных последовательностей между нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные варианты CDR и приведенными в данном документе нуклеотидными последовательностями составляет по меньшей мере 80 и более часто предпочтительно имеет возрастающую степень гомологии или идентичности, составляющую по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и почти 100%.

Таким образом, "вариантная CDR" - это область с определенной гомологией, сходством или идентичностью с основной CDR согласно изобретению, которая обладает биологической функцией, составляющей, без ограничений, по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% от специфичности и/или активности основной CDR.

В то время как сайт или участок для внесения вариации аминокислотной последовательности является predetermined, мутация *per se* не обязательно должна быть predetermined. Например, чтобы оптимизировать введение мутации в заданном сайте, можно провести случайный мутагенез в целевом кодоне или участке и исследовать CDR-варианты антигенсвязывающего белка в отношении оптимальной комбинации необходимой активности. Методы введения заместительных мутаций в predetermined участках ДНК, имеющей известную последовательность, хорошо известны, например это мутагенез с праймерами M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов проводят, применяя методы анализа активности антигенсвязывающего белка, такие как связывание OSMR.

Аминокислотные замены, как правило, включают один остаток; инсерции обычно составляют величину порядка от около одного до около двадцати аминокислотных остатков, хотя возможны значительно большие инсерции. Диапазон делеций составляет от около одного до около двадцати аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях делеций могут быть значительно больше.

Замены, делеций, инсерции или любые их комбинации можно использовать для получения конечного производного или варианта. В общем случае эти изменения проводят для небольшого количества аминокислот, чтобы минимизировать изменения молекулы, в частности иммуногенности и специфичности антигенсвязывающего белка. При этом при определенных обстоятельствах возможны большие изменения. Консервативные замены проводят в общем случае в соответствии со следующей схемой, приведенной в виде табл. 3.

Таблица 3

Исходный остаток	Тиговые замены
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

При выборе замен, которые являются менее консервативными, чем приведенные в табл. 3, происходят значительные изменения функции и иммунологической идентичности. Например, можно проводить замены, которые наиболее сильно влияют на: структуру полипептидного скелета в области изменения, например, структуру альфа-спирали или бета-складчатости; заряд или гидрофобность молекулы в целевом участке; или объем боковой цепи. Замены, для которых в общем случае ожидаются наибольшие изменения в свойствах полипептида, включают те, при которых (а) гидрофильный остаток, например серил или треонил, замещается гидрофобным остатком, например лейцилом, изолейцилом, фенилаланином, валином или аланином; (b) цистеин или пролин замещается любым другим остатком; (c) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например лизил, аргинил или гистидил, замещается электроотрицательным остатком, например глутамином или аспартилом; или (d) остаток, имеющий объемную боковую цепь, например фенилаланин, замещается остатком, не имеющим боковой цепи, например глицином.

Варианты, как правило, демонстрируют качественно идентичную биологическую активность и вызывают идентичный иммунный ответ, что и аналог природного происхождения, хотя при необходимости можно выбирать варианты, которые модифицируют характеристики антигенсвязывающего белка. В альтернативном варианте можно сконструировать вариант таким образом, чтобы изменить биологическую активность антигенсвязывающего белка. Например, как обсуждается в данном документе, можно изменять или удалять участки гликозилирования.

Другие производные антител к OSMR, входящие в объем данного изобретения, включают ковалентные или агрегационные конъюгаты антител к OSMR или их фрагментов с другими белками или полипептидами, такие, как полученные посредством рекомбинантной экспрессии слитых белков и содержащие гетерологичные полипептиды, слитые с N-концом или C-концом полипептида антитела к OSMR. Например, конъюгированным пептидом может быть гетерологичный сигнальный (или лидерный) полипептид, например лидерный пептид дрожжевого альфа-фактора или пептид, такой как эпитопная метка. Слитые белки, содержащие антитела к OSMR, могут содержать пептиды, добавленные, чтобы облегчить очистку или выявление антитела к OSMR (например, poly-His). Полипептид антитела к OSMR также может быть соединен с пептидом FLAG, как описано в Hopp et al., *Bio/Technology*, 6:1204, 1988 и в патенте США № 5011912. Пептид FLAG является высокоантигенным и привносит эпитоп, обратимо связываемый специфическим моноклональным антителом (mAb), что делает возможным осуществление быстрого анализа и облегчает очистку экспрессируемого рекомбинантного белка. Реагенты, применяемые для получения слитых белков, в которых пептид FLAG слит с заданным полипептидом, являются коммерчески доступными (Sigma, St. Louis, MO).

В одном варианте реализации изобретения олигомер получают, используя полипептиды, полученные из иммуноглобулинов. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с разными частями полученных из антител полипептидов (включая Fc-домен), были описаны, например, в Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA*, 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature*, 344:677 и Hollenbaugh et al., 1992, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11.

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к димеру, содержащему два слитых белка, полученных путем слияния OSMR-связывающего фрагмента антитела к OSMR с Fc-областью антитела. Димер можно получить, например, путем вставки продукта генного слияния, кодирующего слитый белок, в соответствующий экспрессионный вектор, экспрессии продукта генного слияния в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным экспрессионным вектором, и создания возможности сборки слитого белка наподобие молекул антител, при которой между Fc-компонентами образуются межцепевые дисульфидные связи с получением димера.

Употребляемый в данном документе термин "Fc-полипептид" включает нативные формы и мутеины полипептидов, полученных из Fc-области антитела. Также включены усеченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирную область, которая стимулирует димеризацию. Слитые белки, содержащие Fc-компоненты (и образуемые из них олигомеры), имеют преимущество, состоящее в облегчении очистки методом аффинной хроматографии на колонках протеина А и протеина G.

Одним из подходящих Fc-полипептидов, описанных в заявке согласно PCT WO 93/10151 (включенной в данный документ посредством ссылки), является одноцепочечный полипептид, простирающийся от N-терминальной шарнирной области до нативного C-конца Fc-области человеческого антитела IgG. Другим подходящим Fc-полипептидом является Fc-мутеин, описанный в патенте США № 5457035 и в Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. Аминокислотная последовательность этого мутеина идентична нативной Fc-последовательности, представленной в WO 93/10151, за исключением того, что аминокислота 19 была изменена с Leu на Ala, аминокислота 20 была изменена с Leu на Glu, а аминокислота 22 была изменена с Gly на Ala. Мутеин демонстрирует сниженную аффинность в отношении Fc-рецепторов.

В других вариантах реализации изобретения переменная часть тяжелой и/или легкой цепи антитела к OSMR может быть замещена переменной частью тяжелой и/или легкой цепи антитела.

Другой метод получения олигомерных производных антител к OSMR включает применение лейциновой молнии. Домены лейциновой молнии представляют собой пептиды, которые стимулируют олигомеризацию белков, в которых они находятся. Изначально лейциновые молнии были выявлены в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., Science, 240:1759-64, 1988) и с тех пор были обнаружены в большом количестве разных белков. Среди известных лейциновых молний есть пептиды природного происхождения и их производные, которые димеризуются или тримеризуются. Примеры доменов лейциновых молний, подходящие для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке согласно PCT WO 94/10308, а лейциновые молнии, полученные из белка D легочного сурфактанта (SPD), описаны в Hoppe et al., 1994, FEBS Letters, 344:191, включенной в данный документ посредством ссылки. Применение модифицированной лейциновой молнии, которое делает возможной стабильную тримеризацию слитого с ней гетерологичного белка, описано в Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. В одном из подходов рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент или производное антитела к OSMR, слитый с пептидом лейциновой молнии, экспрессируют в подходящих клетках-хозяевах, а образуемые растворимые олигомерные фрагменты или производные антител к OSMR восстанавливают из культурального супернатанта.

Ковалентные модификации антигенсвязывающих белков входят в объем данного изобретения и в общем случае, но не всегда, осуществляются после трансляции. Например, некоторые типы ковалентных модификаций антигенсвязывающего белка вносят в молекулу путем проведения реакции между определенными аминокислотными остатками антигенсвязывающего белка и органическим дериватирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-терминальными остатками.

Остатки цистенила наиболее часто приводят в реакцию с α -галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, чтобы получить производные карбоксиметила или карбоксиамидометила. Также остатки цистенила дериватируют путем проведения реакции с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, p-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Остатки гистидила дериватируют путем проведения реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку указанный агент является относительно специфическим в отношении боковой цепи гистидила. Также применим парабромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М растворе какадилата натрия при pH 6,0.

Остатки лизинила и аминотерминальные остатки приводят в реакцию с янтарным ангидридом или ангидридами других карбоновых кислот. Дериватизация этими агентами может приводить к обращению заряда остатков лизинила. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают имидоэферы, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфоновую кислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентан-дион и гликозилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

Остатки аргинила модифицируют путем приведения в реакцию с одним или несколькими традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин.

Для дериватизации остатков аргинина необходимо, чтобы реакция осуществлялась в щелочной среде из-за высокой pK_a гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, такие реагенты могут вступать в реакцию с группами лизина, а также с эpsilon-аминогруппой аргинина.

Можно также проводить определенные модификации остатков тирозила, в особенности интересны случаи введения спектральных меток в остатки тирозила при помощи реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Наиболее часто применяют N-ацетилимидзол и тетранитрометан для образования видов O-ацетил тирозила и 3-нитропроизводных, соответственно. Остатки тирозила йодируют, применяя ^{125}I или ^{131}I , для получения меченых белков для применения в радиоиммуноанализе, при этом подходит описанный выше метод с применением хлорамина T.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) избирательно модифицируют путем взаимодействия с карбодиимидами ($R'-N=C=N--R'$), где R и R' необязательно представляют собой разные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилфенил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартила и глутамина преобразуют в остатки аспарагина и глутамина посредством проведения реакции с ионами аммония.

Дериватизацию с бифункциональными агентами применяют для перекрестного связывания антигенсвязывающих белков с нерастворимой в воде матрицей-подложкой или поверхностью-подложкой для применения в большом количестве способов. Обычно применяемые перекрестносшивающие агенты включают, например, 1,1-бис-(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимид эфиры, например, эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидил эфиры, такие как 3,3'-дителиобис-(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дителио]пропиоимидат, позволяют получать фотоактивируемые промежуточные продукты, которые способны образовывать перекрестные связи в присутствии света. В альтернативном варианте для иммобилизации белков применяют реактивные нерастворимые в воде матрицы, такие как активируемые бромистым цианогеном углеводы, и реактивные субстраты, описанные в патентах США № 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440.

Остатки глутамина и аспарагина часто деаминируют до соответствующих остатков глутамина и аспартила соответственно. В альтернативном варианте эти остатки деаминируют в слабокислых условиях. Любая форма этих остатков входит в объем данного изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серина или треонина, метилирование α -аминогрупп лизина, аргинина и боковых цепей гистидина (Т.Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, p. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации антигенсвязывающего белка, который входит в объем данного изобретения, включает изменение профиля гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, профили гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков гликозилирования, обсуждаемых ниже), так и от клетки- или организма-хозяина, в которой вырабатывается белок. Конкретные экспрессионные системы обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, является N-связанным или O-связанным. N-связывание относится к присоединению углеводного компонента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного компонента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров - N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы - к гидроксикарбоксильной группе, наиболее часто серину или треонину, хотя также могут использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Добавление участков гликозилирования в антигенсвязывающий белок традиционно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она включала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (в случае N-связанных участков гликозилирования). Изменение также можно проводить путем добавления или замещения одного или более остатков серина или треонина в исходной последовательности (в случае O-связанных участков гликозилирования). Чтобы облегчить задачу, аминокислотную последовательность антигенсвязывающего белка предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности, путем введения мутации в заранее выбранных основаниях ДНК, кодирующей полипептид-мишень, чтобы происходила генерация кодонов, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

Другие способы увеличения количества углеводных компонентов антигенсвязывающего белка состоят в ферментативном или химическом сопряжении гликозидов белка. Преимуществом этих способов является то, что они не требуют выработки белка в клетке-хозяине, которая характеризуется возможностью гликозилирования в случае N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от применяемой

схемы сопряжения сахар(а) можно присоединять к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (е) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти методы описаны в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306.

Удаление углеводных компонентов, присутствующих в исходном антигенсвязывающем белке, можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Для химического дегликозилирования необходимо подвергнуть белок воздействию соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров за исключением связывающих сахаров (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом сам полипептид остается нетронутым. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и в Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное отщепление углеводных компонентов полипептидов можно осуществить, применяя разные эндо- и экзогликозидазы, как описано в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Предотвратить гликозилирование в потенциальных участках гликозилирования можно посредством применения соединения туникамицина, как описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование связей белок-N-гликозид.

Другой тип ковалентной модификации антигенсвязывающего белка включает соединения антигенсвязывающего белка с разными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь этим, разные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, способами, описанными в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, в разных позициях антигенсвязывающего белка можно проводить аминокислотные замены, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как ПЭГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения ковалентная модификация антигенсвязывающих белков согласно изобретению включает добавление одной или более меток.

Термин "метящая группа" обозначает любую выявляемую метку. Примеры подходящих метящих групп включают, но не ограничиваются этим, следующие компоненты: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментативные группы (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или predetermined полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, участки связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах реализации изобретения метящая группа сопряжена с антигенсвязывающим белком посредством спейсеров разной длины для снижения потенциального стерического несоответствия. В данной области техники известны разные методы мечения белков, которые можно применять для осуществления настоящего изобретения.

В общем случае метки делятся на разные классы в зависимости от метода их выявления: а) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы; b) магнитные метки (например, магнитные частицы); с) редокс-активные компоненты; d) оптические красители; ферментные группы (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу); e) биотинилированные группы; и f) predetermined полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, участки связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах реализации изобретения метящая группа сопряжена с антигенсвязывающим белком посредством спейсеров разной длины для снижения потенциального стерического несоответствия. В данной области техники известны разные методы мечения белков, которые можно применять для осуществления настоящего изобретения.

Специфические метки включают оптические красители, включая, но не ограничиваясь этим, хромофоры, люминофоры и флуорофоры, при этом последние во многих случаях являются специфическими. Флуорофоры могут быть как "низкомолекулярными" флуорофорами, так и белковыми флуорофорами.

Под "флуоресцентной метой" подразумевается любая молекула, которую можно выявить по ее характерным флуоресцентным свойствам. Подходящие флуоресцентные метки включают, но не ограничиваются этим, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, Lucifer Yellow, Cascade Blue J, техасский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, орегон зеленый, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, родамин и техасский красный (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в "Molecular Probes Handbook" (Richard P. Haugland), включенную в данный документ посредством ссылки.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают, но не ограничиваются этим, зеленый флуоресцентный белок, включая виды GFP Renilla, Ptilosarcus или Aequorea (Chalfie et al., 1994, *Science*, 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3N 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques*, 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β -галактозидазу (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) и Renilla (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, патенты США № 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558). Все вышеперечисленные ссылки включены в данный документ посредством ссылки.

Типовые описанные в данном документе антигенсвязывающие белки обладают свойствами, связанными с уникальным эпитопом OSMR, связываемым антигенсвязывающим белком. Термин "эпитоп" обозначает аминокислоты молекулы-мишени, которые контактируют с антигенсвязывающим белком, например антителом, когда антигенсвязывающий белок связывается с молекулой-мишенью. Эпитоп может быть непрерывным или прерывным (например, (i) в одноцепочечном полипептиде это аминокислотные остатки, которые не являются непрерывными по отношению к друг другу в полипептидной последовательности, но которые в случае молекулы-мишени связываются антигенсвязывающим белком, или (ii) в мультимерном рецепторе, содержащем два или более отдельных компонента, например рецептор A OSMR и gp130 или OSMR и IL-31, это аминокислотные остатки, присутствующие в одном или более из отдельных компонентов, которые связываются антигенсвязывающим белком). Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические зарядовые характеристики. В общем случае антигенсвязывающие белки, специфические в отношении конкретной молекулы-мишени, предпочтительно распознают эпитоп на молекуле-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Способы получения характеристик связывания эпитопа антигенсвязывающим белком хорошо известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, сортировку (перекрестное конкурное связывание) (Miller et al. "Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay", *J. Immunol. Methods* (2011), 365, 118-25), пептидное картирование (например, PEPSOT™) (Albert et al. "The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis", 2008, *Thromb. Haemost.* 99, 634-7), методы мутагенеза, такие как создание химер (Song et al. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients", *J. Virol.* (2010), 84, 6935-6942), аланиновое сканирование (Cunningham and Wells "High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis", *Science*, (1989), 244, 1081-1085), аргининовое сканирование (Lim et al. "A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor", *Biochemistry* (2010), 49, 3797-3804), методы водородно-дейтериевого обмена (Coates et al. "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2009), 23, 639-647), методы перекрестного насыщения ЯМР (Morgan et al. "Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation", *Biochemistry* (2005), 44, 518-23) и кристаллографию (Gerhardt et al. "Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody", *J. Mol. Biol.* (2009), 394, 905-21). Указанные методы отличаются по уровню детализации, которую они обеспечивают в отношении аминокислот, составляющих эпитоп. В примере 4 описан типовой метод сортировки эпитопов.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению включают те, которые содержат эпитоп, перекрывающийся с описанным в данном документе типовым антигенсвязывающим белком, например Ab1, Ab2 или Ab3. В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок содержит эпитоп, идентичный типовым антигенсвязывающим белкам. В других вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок связывает только подгруппу тех же самых аминокислот, что и типовой антигенсвязывающий белок.

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR содержит идентичный или перекрывающийся эпитоп с Ab1, Ab2 или Ab3 и содержит а) переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29; б) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности или идентичный аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11; или в) переменный домен легкой цепи согласно а) и переменный домен тяжелой цепи согласно б).

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR содержит идентичный или перекрывающийся эпитоп с Ab1, Ab2 или Ab3 и содержит переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или идентичный аминокислотной последо-

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

d) HCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 12;

HCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 15; и

HCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 18;

e) HCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 13;

HCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 16; и

HCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 19; или

f) HCDR1, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 14;

HCDR2, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 17; и

HCDR3, содержащую не более трех аминокислотных добавок, делеций или замен по сравнению с последовательностью HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 20.

Предпочтительные антигенсвязывающие белки к OSMR, описанные непосредственно выше, включают те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно a) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно d); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно b) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно e); и те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно c) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно f).

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие вариабельный домен легкой цепи согласно a) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно d), могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 9. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи необязательно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53.

Антигенсвязывающие белки к OSMR, содержащие вариабельный домен легкой цепи согласно b) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно e), могут, необязательно, содержать аминокислоту, отличную от аспарагина (например, аспарагиновую кислоту), в позиции, соответствующей позиции 73 в SEQ ID NO: 10. В таких вариантах реализации изобретения вариабельный домен тяжелой цепи необязательно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54.

Антигенсвязывающие белки, которые содержат идентичный эпитоп или перекрывающийся эпитоп часто демонстрируют перекрестное конкурентное связывание с антигеном. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок согласно изобретению перекрестно конкурирует с Ab1, Ab2 или Ab3. "Перекрестно конкурировать" или "перекрестное конкурентное связывание" означает, что антигенсвязывающие белки конкурируют за один и тот же эпитоп или сайт связывания на мишени. Наличие такого конкурентного связывания можно определить методами анализа, в которых стандартный антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающая часть) предотвращает или ингибирует специфическое связывание исследуемого антигенсвязывающего белка и наоборот. Чтобы определить, конкурирует ли исследуемая молекула со стандартной молекулой за связывание, можно применять многочисленные виды методов анализа конкурентного связывания. Примеры методов анализа, которые можно применять, включают твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), сэндвич-анализ конкурентного связывания (см., например, Stahli et al. (1983), *Methods in Enzymology*, 9:242-253), твердофазный прямой ИФА с биотином и авидином (см., например, Kirkland et al., (1986), *J. Immunol.* 137:3614-9), твердофазный прямой анализ с метками, твердофазный прямой сэндвич-анализ с метками, Lumindex (Jia et al. "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies", *J. Immunological Methods* (2004), 288, 91-98) и поверхностный плазмонный резонанс (Song et al. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients", *J. Virol.* (2010), 84, 6935-42). Типовой метод определения перекрестного конкурентного связывания описан в примере 5. Обычно, если конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать связывание стандартного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70 или 75%. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более.

Полинуклеотиды, кодирующие антигенсвязывающие белки к OSMR.

В данное изобретение включены нуклеиновые кислоты или выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие белки к OSMR, включая антитела, определенные в данном документе. Предпочтительные нуклеиновые кислоты включают те, которые кодируют типовые легкие и тяжелые цепи, описанные в данном документе.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая Ab1 LC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая Ab2 LC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая Ab3 LC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая Ab1 HC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая Ab2 HC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая Ab3 HC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая вариант Ab1 HC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая вариант Ab2 HC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48.

Типовая нуклеиновая кислота, кодирующая вариант Ab3 HC, представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49.

Аспекты изобретения включают полинуклеотидные варианты (например, вследствие вырожденности), которые кодируют описанные в данном документе аминокислотные последовательности.

Аспекты изобретения включают большое количество вариантов реализации, включая, но не ограничиваясь этим, следующие типовые варианты реализации.

Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотид, при этом указанный полинуклеотид кодирует один или более полипептидов, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(A) 1) последовательности варибельного домена легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичной последовательности варибельного домена легкой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 27-29;

2) последовательности варибельного домена тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичной последовательности варибельного домена тяжелой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 9-11;

3) варибельного домена легкой цепи согласно (1) и варибельного домена тяжелой цепи согласно (2); и

(B) варибельного домена легкой цепи, содержащего CDR1, CDR2, CDR3, и/или варибельного домена тяжелой цепи, содержащего CDR1, CDR2, CDR3, которые являются идентичными или отличаются не более чем на три аминокислотные добавки, замены и/или делеции в каждой CDR от следующих последовательностей:

1) CDR1 (SEQ ID NO: 30), CDR2 (SEQ ID NO: 33), CDR3 (SEQ ID NO: 36) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 15), CDR3 (SEQ ID NO: 18) тяжелой цепи Ab1;

2) CDR1 (SEQ ID NO: 31), CDR2 (SEQ ID NO: 34), CDR3 (SEQ ID NO: 37) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 16), CDR3 (SEQ ID NO: 19) тяжелой цепи Ab2;

3) CDR1 (SEQ ID NO: 32), CDR2 (SEQ ID NO: 35), CDR3 (SEQ ID NO: 38) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 17), CDR3 (SEQ ID NO: 20) тяжелой цепи Ab3.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой или выделенной нуклеиновой кислотой, является компонентом антигенсвязывающего белка, который связывает OSMR.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие описанным в данном документе аминокислотным последовательностям, предназначенные для применения в качестве зондов или праймеров для выделения нуклеиновых кислот или в качестве запрашиваемых последовательностей для поиска по базам данных, можно получить посредством "обратной трансляции" из аминокислотных последовательностей или путем определения областей аминокислотной идентичности с полипептидами, для которых была определена кодирующая последовательность ДНК. Для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей антигенсвязывающие белки к OSMR или необходимые комбинации полипептидных фрагментов антигенсвязывающих белков к OSMR, можно применять хорошо известную процедуру полимеразной цепной реакции (ПЦР). Олигонуклеотиды, которые определяют необходимые концы комбинации фрагментов ДНК, используют в качестве 5'- и 3'-праймеров. Олигонуклеотиды могут дополнительно содержать сайты распознавания для рестрикционных эндонуклеаз, чтобы облегчить вставку амплифицированной комбинации фрагментов ДНК в экспрессионный вектор. Методы ПЦР описаны в Saiki et al., Science, 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San

Diego (1989), p. 189-196; и PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. ДНК включает, например, κДНК, геномную ДНК, химически синтезированную ДНК, ДНК, амплифицированную при помощи ПЦР, и их комбинации. Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению включают полноразмерные гены или молекулы κДНК, а также комбинации их фрагментов. Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению предпочтительно получены из человеческих источников, но в изобретение также включены те, которые получены от нечеловеческих видов.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновые кислоты согласно изобретению представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. "Выделенной нуклеиновой кислотой" является нуклеиновая кислота, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого была выделена нуклеиновая кислота, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из источников природного происхождения. В случае нуклеиновых кислот, синтезированных ферментативным путем с матрицы или химическим путем, таких как, например, продукты ПЦР, молекулы κДНК или олигонуклеотиды, следует понимать, что полученные таким способом нуклеиновые кислоты являются выделенными нуклеиновыми кислотами. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в форме отдельного фрагмента или в виде компонента более крупной нуклеотидной конструкции. В одном предпочтительном варианте реализации изобретения нуклеиновые кислоты являются в значительной степени очищенными от загрязняющего эндогенного материала. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты получена из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере один раз в значительной степени чистой форме и в количестве и концентрации, которые позволяют проводить выявление, манипуляции и восстановление составляющих ее нуклеотидных последовательностей при помощи стандартных биохимических методов (таких как те, которые описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно получают и/или конструируют в форме открытой рамки считывания, которая не прерывается внутренними нетранслируемыми последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут присутствовать в направлении 5' или 3' от открытой рамки считывания, где их присутствие не мешает проведению манипуляций или экспрессии кодирующей области.

В настоящее изобретение также включены нуклеиновые кислоты или выделенные нуклеиновые кислоты, которые гибридизируются в условиях умеренной жесткости и более предпочтительно в условиях высокой жесткости с нуклеиновыми кислотами, кодирующими антигенсвязывающие белки к OSMR, как описано в данном документе. Основные параметры, которые влияют на выбор условий гибридизации, и руководство по подбору подходящих условий приведены в Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., главы 9 и 11; и *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., разделы 2.10 и 6.3-6.4), они могут легко быть определены специалистами в данной области техники на основании, например, длины и/или состава оснований ДНК. Один из способов получения условий умеренной жесткости включает применение раствора для предварительной промывки, содержащего 5×SSC, 0,5% ДСН, 1,0 мМ ЭДТК (рН 8,0), гибридизационного буфера из около 50% формамида, 6×SSC и температуры гибридизации около 55°C (или других похожих гибридизационных растворов, таких как раствор, содержащий около 50% формамида, с температурой гибридизации около 42°C), и условий промывки, соответствующих около 60°C в 0,5×SSC, 0,1% ДСН. В общем случае условия высокой жесткости определяются как условия гибридизации, приведенные выше, но промывку проводят приблизительно при 68°C, 0,2×SSC, 0,1% ДСН. SSPE (1×SSPE представляет собой 0,15 М NaCl, 10 мМ NaH₂PO₄ и 1,25 мМ ЭДТА, рН 7,4) можно заменить на SSC (1×SSC представляет собой 0,15 М NaCl и 15 мМ цитрата натрия) в гибридизационном и промывочном буферах; промывку проводят на протяжении 15 мин после завершения гибридизации. Следует понимать, что температуру при промывке и концентрацию соли при промывке можно при необходимости корректировать, чтобы получить необходимую степень жесткости, применяя основные принципы, которые определяют реакции гибридизации и стабильность спиралей, как известно специалистам в данной области техники и дополнительно описано ниже (см., например, Sambrook et al., 1989). При проведении гибридизации нуклеиновой кислоты с нуклеиновой кислотой-мишенью с неизвестной последовательностью длиной гибрида считается длина гибридизирующейся нуклеиновой кислоты. При поведении гибридизации нуклеиновых кислот с известными последовательностями длину гибрида можно определить путем выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и определения области или областей оптимальной комплементарности последовательностей. Температура гибридизации для гибридов, предполагаемая длина которых составляет менее 50 пар оснований, должна составлять на 5-10°C меньше, чем температура плавления (T_m) гибрида, где T_m определяется в соответствии со следующими уравнениями. Для гибридов длиной менее 18 пар оснований: T_m (°C)=2(№ оснований A+T)+4(№ оснований G+C). Для гибридов длиной более 18 пар оснований: T_m (°C)=81,5+16,6(log₁₀

$[Na^+]+0,41(\% G+C)-(600/N)$, где N количество оснований в гибриде, а $[Na^+]$ - концентрация ионов натрия в гибридизационном буфере ($[Na^+]$ для $1 \times SSC=0,165 M$). Предпочтительно каждая гибридизирующаяся нуклеиновая кислота имеет длину, составляющую по меньшей мере 15 нуклеотидов (или более предпочтительно по меньшей мере 18 нуклеотидов, или по меньшей мере 20 нуклеотидов, или по меньшей мере 25 нуклеотидов, или по меньшей мере 30 нуклеотидов, или по меньшей мере 40 нуклеотидов, или наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов) или по меньшей мере 25% (более предпочтительно по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%) от длины нуклеиновой кислоты согласно изобретению, с которой она гибридизируется, и обладает по меньшей мере 60% идентичности последовательностей (более предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,5%) с нуклеиновой кислотой согласно изобретению, с которой она гибридизируется, при этом идентичность последовательностей определяют путем сравнения последовательностей гибридизирующихся нуклеиновых кислот при их выравнивании таким образом, чтобы максимизировать перекрытие и идентичность и минимизировать гэпы в последовательностях, как более подробно описано выше.

Варианты согласно изобретению обычно получают при помощи сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей антигенсвязывающий белок, применяя кассеты или ПЦР-мутагенез или другие известные в данной области техники методы, чтобы получить ДНК, кодирующую вариант, а затем экспрессируя рекомбинантную ДНК в клеточной культуре, как описано в данном документе. При этом фрагменты антигенсвязывающих белков, содержащие варианты CDR, имеющие до около 100-150 остатков, можно получить посредством *in vitro* синтеза, используя традиционные методы. Как правило, варианты демонстрируют качественно такую же биологическую активность, что и аналог природного происхождения, например связывание с OSMR, хотя можно выбирать варианты, имеющие модифицированные характеристики, как более детально описано ниже.

Специалистам в данной области техники понятно, что вследствие вырожденности генетического кода можно получить очень большое количество нуклеиновых кислот, которые все кодируют CDR (а также тяжелую и легкую цепи или другие компоненты антигенсвязывающего белка) согласно настоящему изобретению. Таким образом, после определения конкретной аминокислотной последовательности специалисты в данной области техники могут получить любое количество разных нуклеиновых кислот, просто модифицируя последовательность одного или более кодонов так, чтобы не происходило изменения аминокислотной последовательности кодируемого белка.

В настоящем изобретении также предложены экспрессионные системы и конструкции в форме плазмид, экспрессионных векторов, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере один из вышеописанных полинуклеотидов. Кроме того в изобретении предложены клетка-хозяева, содержащие такие экспрессионные системы или конструкции.

Как правило, применяемые в случае какой-либо клетки-хозяина экспрессионные векторы содержат последовательности для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности, называемые общим термином "фланкирующие последовательности", в некоторых вариантах реализации изобретения, как правило, содержат одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайты сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который необходимо экспрессировать, и элемент селективируемого маркера. Каждая из этих последовательностей обсуждается ниже.

Необязательно, вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", т.е. молекулу олигонуклеотида, расположенную в 5'- и 3'-конце последовательности, кодирующей антигенсвязывающий белок к OSMR; олигонуклеотидная последовательность кодирует polyHis (такую как hexaHis) или другую "метку", такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Эту метку, как правило, сливают с полипептидом после экспрессии полипептида, и она может служить средством для аффинной очистки или выявления антигенсвязывающего белка к OSMR в клетке-хозяине. Аффинную очистку можно проводить, например, при помощи колоночной хроматографии, используя антитела против указанной метки в качестве аффинной матрицы. Необязательно, метку можно впоследствии удалять из очищенного антигенсвязывающего белка к OSMR разными методами, такими как применение пептидаз для отщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т.е. полученными от того же вида и/или из того же штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. полученными от вида и/или из

штамма, отличного от клетки-хозяина), гибридными (т.е. комбинацией последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. Соответственно, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение при условии, что фланкирующая последовательность функциональна в клетке-хозяине и может быть активирована механизмом клетки-хозяина.

Фланкирующие последовательности, применяемые в векторах согласно данному изобретению, можно получить любым из нескольких хорошо известных в данной области техники способов. Как правило, фланкирующие последовательности, применяемые в данном документе, были предварительно идентифицированы при помощи картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами и, следовательно, могут быть выделены из подходящего тканевого источника при помощи соответствующих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В данном случае фланкирующую последовательность можно синтезировать, применяя описанные в данном документе методы синтеза или клонирования нуклеиновых кислот.

Вне зависимости от того, вся или только часть фланкирующей последовательности является известной, ее можно получить, применяя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и/или проводя скрининг геномной библиотеки при помощи подходящего зонда, такого как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности, полученный от того же или от другого вида. Если фланкирующая последовательность известна, можно выделить фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, из более крупного участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или гены. Выделение можно осуществить при помощи расщепления рестрикционными эндонуклеазами, чтобы получить соответствующий фрагмент ДНК, с последующим выделением при помощи очистки в агарозном геле, колоночной хроматографии Qiagen® (Chatsworth, CA) или других известных специалисту в данной области техники методов. Выбор подходящих ферментов для осуществления этой цели очевиден для специалиста в данной области техники.

Точка начала репликации, как правило, представляет собой часть приобретенных на коммерческой основе прокариотических экспрессионных векторов и способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайт, соответствующий точке начала репликации, его можно химически синтезировать на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а разные вирусные точки (например, SV40, полиомы, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (ВВС) или вирусов папилломы, таких как ВПЧ или вирус папилломы КРС) подходят для клонирования векторов в клетках млекопитающих. В общем случае компонент точки начала репликации не является необходимым для экспрессионных векторов млекопитающих (например, точку SV40 часто используют только потому, что она также содержит ранний вирусный промотор).

Последовательность терминации транскрипции, как правило, расположена в 3'-конце кодирующей области полипептида и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой богатый G-C фрагмент, за которым следует поли-Т последовательность. Хотя последовательность можно легко клонировать из библиотеки или даже приобрести на коммерческой основе, ее также нетрудно синтезировать, применяя методы синтеза нуклеиновых кислот, такие как те, которые описаны в данном документе.

Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, растущей в селективной культуральной среде. Типовые гены селективируемых маркеров кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину в случае прокариотических клеток-хозяев; (b) дополняют ауксотрофный дефицит клетки или (с) поставляют необходимые питательные вещества, недоступные из комплексной или определенной среды. Специфическими селективируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Преимущественным также является использование гена устойчивости к неомицину для проведения селекции как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах.

Для амплификации гена, предназначенного для экспрессии, можно использовать другие селективируемые гены. Амплификация представляет собой процесс, в котором происходит тандемная реитерация генов, необходимых для выработки белка, необходимого для роста или выживания клеток, в пределах хромосом последовательных поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих для клеток млекопитающих селективируемых маркеров включают гены дигидрофолат редуктазы (DHFR) и не содержащие промотор гены тимидинкиназы. Трансформанты клеток млекопитающих помещают в условия селекционного давления, к выживанию в которых адаптированы исключительно трансформанты вследствие присутствия в векторе селективируемого гена. Селекционное давление осуществляют путем культивирования трансформированных клеток в условиях, в которых концентрация селекционного агента в среде постепенно возрастает, что приводит к амплификации как селективируемого гена, так и ДНК, кодирующей другой ген, такой как антигено связывающего белка, которое связывается с полипептидом

OSMR. В результате из амплифицированной ДНК синтезируется повышенное количество полипептида, такого как антигенсвязывающий белок к OSMR.

Участок связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательностью Козака (эукариоты). Данный элемент, как правило, расположен в направлении 3' относительно промотора и в 5' относительно кодирующей последовательности полипептида, который необходимо экспрессировать. В определенных вариантах реализации изобретения одна или более кодирующих областей могут быть функционально связанными с внутренним участком связывания рибосомы (IRES), что делает возможной трансляцию двух открытых рамок считывания с одного РНК-транскрипта.

В некоторых случаях, когда в экспрессионной системе эукариотической клетки-хозяина необходимо гликозилирование, можно проводить манипуляции с разными пре- или пропоследовательностями, чтобы улучшить гликозилирование или выход. Например, можно внести изменения в сайт расщепления пептидазами конкретного сигнального пептида или добавить пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в позиции -1 (относительно первой аминокислоты зрелого белка) одну или более дополнительных аминокислот, свойственных для экспрессии, которые не были полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или два аминокислотных остатка, находящихся в сайте расщепления пептидазами, присоединенных к аминоконцу. В альтернативном варианте использование некоторых сайтов ферментативного расщепления может привести к получению немного усеченной формы необходимого полипептида в случае, если расщепление ферментом происходит в такой области в пределах зрелого полипептида.

Экспрессионные и клонирующие векторы согласно изобретению, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей антигенсвязывающий белок к OSMR. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т.е. в направлении 5') стартового кодона структурного гена (в общем случае в пределах от около 100 до 1000 п.о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Традиционно промоторы относят к одному из двух классов: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы иницируют повышенные уровни транскрипции из находящейся под их управлением ДНК в ответ на определенные изменения культуральных условий, такие как наличие или отсутствие питательных веществ или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы постоянно транскрибируют ген, с которым они функционально связаны, т.е. слабо регулируют или не регулируют экспрессию генов. Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых множеством потенциальных клеток-хозяев. Подходящий промотор функционально связывают с ДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепь, содержащую антигенсвязывающий белок к OSMR согласно изобретению, путем удаления промотора из исходной ДНК при помощи расщепления рестрикционным ферментом и вставки необходимой промоторной последовательности в вектор.

Также в данной области техники хорошо известны промоторы, подходящие для применения в случае дрожжевых хозяев. С дрожжевыми промоторами предпочтительно используют дрожжевые энхансеры. Промоторы, подходящие для применения в случае клеток-хозяев млекопитающих, хорошо известны и включают, но не ограничиваются этим, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы теплового шока или промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают, но не ограничиваются этим, ранний промотор SV40 (Benoist et al., 1981, *Nature*, 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3' длинном концевом повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto et al., 1980, *Cell*, 22:787-797); промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промотор и регуляторные последовательности гена металлотинина (Prinster et al., 1982, *Nature*, 296:39-42) и прокариотические промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); или промотор *tac* (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Также интерес представляют следующие транскрипционные регуляторные области животного происхождения, которые проявляют тканевую специфичность и используются в трансгенных животных: регуляторная область гена эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, *Cell*, 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology*, 7:425-515); регуляторная область гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, *Nature*, 315:115-122); регуляторная область гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, *Cell*, 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature*, 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); регуляторная область вируса опухоли молочной железы мышей, которая активна в клетках семенников, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, *Cell*, 45:485-495); регуляторная область гена альбумина, которая активна в

печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); регуляторная область гена альфа-фетопротеина, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science*, 253:53-58); регуляторная область гена альфа 1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); регуляторная область гена бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках (Mogran et al., 1985, *Nature*, 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell*, 46:89-94); регуляторная область гена основного белка миелина, которая активна в клетках олигодендроцитов головного мозга (Readhead et al., 1987, *Cell*, 48:703-712); регуляторная область гена легкой цепи-2 миозина, которая активна в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature*, 314:283-286); регуляторная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science*, 234:1372-1378).

Энхансерную последовательность можно вставлять в вектор, чтобы повысить транскрипцию ДНК, кодирующей легкую цепь или тяжелую цепь, содержащую антигенсвязывающий белок к OSMR согласно изобретению, высшими эукариотами. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, длина которых обычно составляет 10-300 п.о., которые воздействуют на промотор, повышая транскрипцию. Энхансеры являются относительно ориентационно и позиционно независимыми и могут быть обнаружены как в 5', так и в 3' направлении относительно транскрипционной единицы. Известны некоторые энхансерные последовательности, доступные из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротеина и инсулина). При этом, как правило, используют энхансеры, полученные из вирусов. Энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансеры аденовирусов известны в данной области техники и являются типовыми энхансерными элементами для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер может быть расположен в векторе как в 5', так и в 3' направлении относительно кодирующей последовательности, как правило, он расположен в направлении 5' от промотора. В экспрессионный вектор можно включать последовательность, кодирующую соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), чтобы стимулировать внеклеточную секрецию антител. Выбор сигнального или лидерного пептида зависит от типа клеток-хозяев, в которых должно вырабатываться антитело, а нативную сигнальную последовательность можно замещать гетерологичной сигнальной последовательностью. Примеры сигнальных пептидов, функциональных в клетках-хозяевах млекопитающих, включают следующие пептиды: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в Cosman et al., 1984, *Nature*, 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в Европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в Европейском патенте № 0460846.

Вектор может содержать один или более элементов, которые облегчают экспрессию, когда вектор интегрируется в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003, *Biotechnol. Prog.* 19:1433-38) и участок прикрепления к матриксу (MAR). MAR опосредуют структурную организацию хроматина и могут защищать интегрированный вектор от "позиционного" эффекта. Таким образом, MAR исключительно полезны, когда вектор используют для создания стабильных трансфектантов. В данной области техники известно большое количество природных и синтетических MAR-содержащих нуклеиновых кислот, например, патенты США № 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Экспрессионные векторы согласно изобретению можно конструировать на основе исходного вектора, например, коммерчески доступного вектора. Такие векторы могут содержать или могут не содержать все необходимые фланкирующие последовательности. Если одна или более из описанных в данном документе фланкирующих последовательностей не присутствуют в векторе, их можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы получения каждой из фланкирующих последовательностей хорошо известны специалисту в данной области техники.

После того как вектор был сконструирован, а молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь, тяжелую цепь или легкую цепь и тяжелую цепь, содержащую антигенсвязывающую последовательность к OSMR, была вставлена в соответствующий участок вектора, полный вектор можно вносить в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Перенос экспрессионного вектора для антигенсвязывающего белка к OSMR в выбранную клетку-хозяина можно осуществлять хорошо известными методами, включая трансфекцию, инфицирование, совместную преципитацию фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, ДЭАЭ-декстран-опосредуемую трансфекцию или другие известные методы. Выбранный метод частично зависит от используемой клетки-хозяина. Эти методы и другие подходящие методы хорошо известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в Sambrook et al., 2001, выше.

При культивировании в подходящих условиях клетка-хозяин синтезирует антигенсвязывающий белок к OSMR, который впоследствии можно извлечь из культуральной среды (если секреция из клетки-хозяина происходит в среду) или непосредственно из вырабатываемой его клетки-хозяина (если секреция не происходит). Выбор подходящей клетки-хозяина зависит от разных факторов, таких как необходимые уровни экспрессии, желаемые или необходимые для активности полипептидные модификации

(такие как гликозилирование или фосфорилирование), и легкость сворачивания в биологически активную молекулу. Клетка хозяин может быть эукариотической или прокариотической.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, иммортализованные клеточные линии, доступные от Американской коллекции типовых культур (АТСС), и любые известные в данной области техники клеточные линии, используемые в экспрессионных системах, которые могут быть использованы для получения рекомбинантных полипептидов согласно изобретению. В общем случае клетки-хозяев трансформируют рекомбинантным экспрессионным вектором, который содержит ДНК, кодирующую необходимый полипептид антитела к OSMR. Среди клеток-хозяев, которые можно применять, есть прокариоты, дрожжевые или высшие эукариотические клетки. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы. Высшие эукариотические клетки включают клетки насекомых и устойчивые клеточные линии млекопитающего происхождения. Примеры подходящих клеточных линий млекопитающих включают линию почек обезьян COS-7 (АТСС CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell, 23:175), L-клетки, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (АТСС CCL 163), клетки яичников китайского хомяка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO, и родственные клеточные линии, которые растут в бессывороточных средах (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology, 28:31), клетки HeLa, клеточные линии ВНК (АТСС CRL 10) и клеточную линию CVI/EBNA, полученную из линии почек африканской зеленой мартышки CVI (АТСС CCL 70), как описано в McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821, человеческие эмбриональные клетки почек, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, человеческие эпидермальные клетки A431, человеческие клетки Colo205, другие трансформированные клеточные линии приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из *in vitro* культуры первичной ткани, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. Необязательно, клеточные линии млекопитающих, например, такие как HepG2/3B, KB, NIH 3T3 или S49, можно использовать для экспрессии полипептида, если полипептид необходимо использовать в разных методах анализа сигнальной трансдукции или репортерного анализа. В альтернативном варианте полипептид можно получать в низших эукариотах, таких как дрожжи, или прокариотах, таких как бактерии. Подходящие дрожжи включают штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *Candida* или любые дрожжевые штаммы, способные экспрессировать гетерологичные полипептиды. Подходящие бактериальные штаммы включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любые бактериальные штаммы, способные экспрессировать гетерологичные полипептиды. Если полипептиды вырабатывается в дрожжах или бактериях, может возникнуть необходимость модифицировать такой полипептид, например, путем фосфорилирования или гликозилирования соответствующих участков, чтобы получить функциональный полипептид. Такие ковалентные присоединения можно осуществлять, используя известные химические или ферментативные способы. Полипептид также можно получить, функционально связав нуклеиновую кислоту или выделенную нуклеиновую кислоту согласно изобретению с подходящими регуляторными последовательностями в одном или более экспрессионных векторах насекомых и применяя экспрессионную систему насекомых. Материалы и способы для получения экспрессионных систем на основе клеток бакуловирусов/насекомых доступны на коммерческой основе в форме наборов, например, от Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A. (набор MaxVac®), а такие методы хорошо известны в данной области техники и описаны в Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) и Luckow and Summers, Bio/Technology, 6:47 (1988). Для получения полипептидов также можно применять бесклеточные трансляционные системы, использующие РНК, полученные из описанных в данном документе конструкций нуклеиновых кислот. Подходящие клонирующие и экспрессионные векторы для применения в бактериальных, грибных, дрожжевых и млекопитающих клетках-хозяевах описаны в Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит нуклеиновую кислоту или выделенную нуклеиновую кислоту согласно изобретению, предпочтительно функционально связанная по меньшей мере с одной последовательностью регуляции экспрессии, представляет собой "рекомбинантную клетку-хозяина".

В определенных вариантах реализации изобретения отбор клеточных линий можно проводить, определяя, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и постоянно вырабатывают антигенсвязывающие белки со свойствами связывания OSMR. В другом варианте реализации изобретения может быть выбрана клеточная линия из В-клеточной линии дифференцировки, которая не вырабатывает собственных антител, но обладает способностью вырабатывать и секретировать гетерологичные антитела.

Истощающие клетки антигенсвязывающие белки к OSMR

В предпочтительных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR связывает OSMR и ингибирует связывание OSM и/или IL-31, тем самым снижая OSM- и/или IL-31-опосредуемый сигналинг в экспрессирующих OSMR клетках. При этом в определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR связывает OSMR и нацелен на истощение экспрессирующих OSMR клеток. В разных аспектах антигенсвязывающий белок к OSMR связывает OSMR и ингибирует связывание OSM и/или IL-31 и нацелен на истощение OSMR-клеток.

Истощающие клетки антигенсвязывающие белки к OSMR исключительно полезны для лечения за-

болеванний или нарушений, связанных со сверхэкспрессией OSMR, например аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний, заболеваний или нарушений, связанных с накоплением или перестройкой внеклеточного матрикса, или опухолей, характеризующихся экспрессией OSMR. Способы нацеливания на клетки антигенсвязывающих белков, например, антител, хорошо известны в данной области техники. Типовые варианты реализации изобретения обсуждаются ниже.

Конъюгаты антитела с лекарственным препаратом.

Варианты реализации изобретения включают конъюгаты антитела с лекарственным препаратом (ADC). В общем случае ADC содержит антитело, конъюгированное с химиотерапевтическим агентом, например цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином или радиоактивным агентом. Для конъюгации лекарственного препарата с антителом можно использовать молекулу линкера. В данной области техники известно большое количество линкеров и лекарственных препаратов, применимых в технологии ADC, которые можно использовать в вариантах реализации настоящего изобретения. (См. US 20090028856; US 2009/0274713; US 2007/0031402; WO 2005/084390; WO 2009/099728; US 5208020; 5416064; 5475092; 5585499; 6436931; 6372738; и 6340701, которые все включены в данный документ посредством ссылки).

Линкеры.

В определенных вариантах реализации изобретения ADC содержит линкер, состоящий из одного или более линкерных компонентов. Типовые линкерные компоненты включают 6-малеимидапроил, малеимидопропаноил, валин-цитруллин, аланин-фенилаланин, п-аминобензил-оксикарбонил и те, которые получены в результате конъюгации с линкерными компонентами, включая, но не ограничиваясь этим, N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноат ("SPP"), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1 карбоксилат ("SMCC", также называемый в данном документе "MCC") и N-сукцинимидил (4-йодоацетил)аминобензоат ("SIAB").

Линкеры могут быть "отщепляемыми" линкерами или "неотщепляемыми" линкерами (Ducy and Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13; в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки). Отщепляемые линкеры конструируют так, чтобы они отделялись от лекарственного препарата при воздействии определенных факторов окружающей среды, например, при поглощении клеткой-мишенью. Отщепляемые линкеры включают кислотлабильные линкеры, чувствительные к протеазам линкеры, фотоллабильные линкеры, диметилловые линкеры или дисульфид-содержащие линкеры. Неотщепляемые линкеры остаются ковалентно связанными по меньшей мере с одной аминокислотой антитела и лекарственным препаратом после поглощения и разрушения в клетке-мишени. Типовым неотщепляемым линкером является MCC.

Лекарственные препараты.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело конъюгировано с химиотерапевтическим агентом. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиоптепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленмины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адоцелезин, карцелезин и бицелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI); элейтеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамиид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности калихеамицин гамма 1 и калихеамицин тета I, см., например, Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); динемидин, включая динемидин А; эсперамидин, а также неокарциностаин хромофор и близкие хромопротеин енедин антибиотические хромофоры); аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карцинофилин; хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (включая морфолинодоксорубин, цианоморфолинодоксорубин, 2-пирролинодоксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, нитомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромидин, пуромидин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностаин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестостерон; ингибиторы функции коры надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; подкрепляющая добавка к фолиевой кислоте, такая как фролиновая кислота; ацеллатон; альдофосфамид гилко-

зид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфомитин; эллиптиниум ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубидин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогеманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозил ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) и доксетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; капецитабин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленного выше препаратов.

Также в это определение включены антигормональные агенты, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антианδροгены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserелин; миРНК и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленного выше препаратов. Другие хемотерапевтические агенты, которые можно использовать в настоящем изобретении, раскрыты в публикации патента США № 20080171040 или публикации патента США № 20080305044, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Предусматривается, что антитело может быть конъюгировано с двумя или более разными хемотерапевтическими агентами или фармацевтическая композиция может содержать смесь антител, при этом компоненты антител являются идентичными за исключением того, что они конъюгированы с разными хемотерапевтическими агентами. Такие варианты реализации изобретения могут быть целесообразными при нацеливании на множественные биологические пути клетки-мишени.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения ADC содержит антитело, конъюгированное с одной или более молекулами майтанзиноидов, которые являются митотическими ингибиторами, действие которых состоит в ингибировании полимеризации тубулина. Майтанзиноиды, включая разные модификации, описаны в патентах США № 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533 и WO 2009/099728. Майтанзиноидные компоненты лекарственного препарата можно выделить из естественных источников, получить при помощи рекомбинантных технологий или получить синтетическим путем. Типовые майтанзиноиды включают С-19-дехлор (патент США № 4256746), С-20-гидрокси (или С-20-деметил) ± С-19-дехлор (патенты США № 4307016 и 4361650), С-20-деметокси (или С-20-ацилокси (-OCOR), ± дехлор (патент США № 4294757), С-9-SH (патент США № 4424219), С-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (патент США № 4331598), С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США № 4450254), С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866), С-15-метокси (патенты США № 4313946 и 4315929), С-18-N-деметил (патенты США № 4362663 и 4322348) и 4,5-дезоксид (патент США № 4371533).

В зависимости от необходимого типа связи в качестве соединительной позиции можно использовать разные позиции майтанзиноидных соединений. Например, для образования эфирной связи подходят позиция С-3, содержащая гидроксильную группу, позиция С-14, модифицированная гидроксиметилом, позиция С-15, модифицированная гидроксильной группой, и позиция С-20, содержащая гидроксильную группу (патенты США № 5208020, RE39151 и 6913748; заявки на патент США № 20060167245 и 20070037972 и WO 2009/099728).

Предпочтительные майтанзиноиды включают те, которые известны в данной области техники как DM1, DM3 и DM4 (заявки на патент США № 2009/030924 и 2005/0276812, включенные в данный документ посредством ссылки).

ADC, содержащие майтанзиноиды, способы получения таких ADC и их терапевтическое применение раскрыто в патентах США № 5208020 и 5416064, заявке на патент США № 20050276812 и WO 2009099728 (все включены в данный документ посредством ссылки). Линкеры, которые можно использовать для получения майтанзиноидных ADC, известны в данной области техники (патент США № 5208020 и заявки на патент США № 2005/016993 и 2009/0274713; все включены в данный документ посредством ссылки). Майтанзиноидные ADC, содержащие линкер SMCC, можно получить так, как описано в заявке на патент США № 2005/0276812.

Антитела с усиленной эффекторной функцией.

Одной из функций Fc-части антитела является взаимодействие с иммунной системой, когда антите-

ло связывает свою мишень. Это называется "эффекторной функцией". Взаимодействие приводит к анти-телозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимому клеточному фагоцитозу (АЗКФ) и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). АЗКЦ и АЗКФ опосредуются через связывание Fc с Fc-рецепторами на поверхности клеток иммунной системы. КЗЦ опосредуется через связывание Fc с белками системы комплемента, например, C1q.

Подклассы IgG различаются по своей способности опосредовать эффекторные функции. Например, IgG1 намного превосходит IgG2 и IgG4 в опосредовании АЗКЦ и КЗЦ. Таким образом, в вариантах реализации изобретения, в которых происходит нацеливание на экспрессирующую OSMR клетку с целью ее разрушения, предпочтительным является анти-OSMR IgG1 антитело.

Эффекторную функцию антитела можно повысить или снизить путем введения одной или более мутаций в Fc. Варианты реализации изобретения включают антигенсвязывающие белки, например, антитела, содержащие Fc, сконструированную для повышения эффекторной функции (патент США 7317091 и Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; в полном объеме включенные в данный документ посредством ссылки). Типовые молекулы IgG1 Fc, обладающие повышенной эффекторной функцией, включают (на основании схемы нумерации Кабата) те, которые содержат следующие замены:

S239D/I332E
 S239D/A330S/I332E
 S239D/A330L/I332E
 S298A/D333A/K334A
 P247I/A339D
 P247I/A339Q
 D280H/K290S
 D280H/K290S/S298D
 D280H/K290S/S298V
 F243L/R292P/Y300L
 F243L/R292P/Y300L/P396L
 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
 G236A/S239D/I332E
 K326A/E333A
 K326W/E333S
 K290E/S298G/T299A
 K290N/S298G/T299A
 K290E/S298G/T299A/K326E
 K290N/S298G/T299A/K326E

Дополнительные варианты реализации изобретения включают антигенсвязывающие белки, например, антитела, содержащие Fc, сконструированную для снижения эффекторной функции. Типовые молекулы Fc, обладающие сниженной эффекторной функцией, включают (на основании схемы нумерации Кабата) те, которые содержат следующие замены:

N297A (IgG1)
 L234A/L235A (IgG1)
 V234A/G237A (IgG2)
 L235A/G237A/E318A (IgG4)
 H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
 C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
 C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
 L234F/L235E/P331S (IgG1)
 S267E/L328F (IgG1)

Другим способом повышения эффекторной функции IgG Fc-содержащих белков является уменьшение фукозилирования Fc. Удаление коровой фукозы из 2-антенарных олигосахаридов комплексного типа, присоединенных к Fc, значительно повышает эффекторную функцию АЗКЦ без изменений в связывании антигена или эффекторной функции КЗЦ. Известно несколько путей снижения или устранения фукозилирования Fc-содержащих молекул, например антител. Они включают рекомбинантную экспрессию в некоторых клеточных линиях млекопитающих, включая клеточную линию с геном нокаутом FUT8, вариантную линию CHO Lec13, клеточную линию крысиной гибридомы YB2/0, клеточную линию, содержащую малую интерферирующую РНК, в частности против гена FUT8, и клеточную линию, коэкспрессирующую β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III α -маннозидазу Гольджи II. В альтернативном варианте Fc-содержащую молекулу можно экспрессировать в клетке, не принадлежащей мле-

копитающему, такой как растительная клетка, дрожжевая или прокариотическая клетка, например *E. coli*. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения композиция содержит антитело, например, Ab1, Ab2 или Ab3, характеризующееся сниженным фукозилированием или отсутствием фукозилирования.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного или множества антигенсвязывающих белков согласно изобретению вместе с фармацевтически эффективными разбавителями, носителем, солюбилизатором, эмульсификатором, консервантом и/или адьювантом. В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. Фармацевтические композиции согласно изобретению включают, но не ограничиваются этим, жидкие, замороженные и лиофилизованные композиции.

Предпочтительно материалы лекарственного состава являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. В конкретных вариантах реализации изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего белка к OSMR, например OSMR-связывающего антитела.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция может содержать материалы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, аромата, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проницаемости композиции. В таких вариантах реализации изобретения подходящие материалы включают, но не ограничиваются этим, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемобразующие агенты (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульсифицирующие агенты; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалконий хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенолиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; сурфактанты или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, трилоксапал); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); агенты, повышающие тоничность (такие как галиды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средства доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адьюванты. См. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В определенных вариантах реализации изобретения оптимальную фармацевтическую композицию определяет специалист в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и необходимой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах реализации изобретения такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* высвобождения и скорость *in vivo* выведения антигенсвязывающих белков согласно изобретению. В определенных вариантах реализации изобретения основной наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может быть водным или неводным. Например, подходящий наполнитель или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную цереброспинальную жидкость, возможно, с добавлением других материалов, традиционно применяемых в композициях для парентерального введения. Дополнительными типовыми наполнителями являются нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В конкретных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит Трис-буфер с pH около 7,0-8,5 или ацетатный буфер с pH около 4,0-5,5 и может дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных вариантах реализации изобретения композиции антигенсвязывающего белка к OSMR можно подготовить к хранению, смешав выбранную композицию, имеющую необходимую степень очистки, с необязательными агентами (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в форме лиофилизованной таблетки или водного раствора. Дополнительно, в определенных вариантах реализации изобретения продукт антигенсвязывающего белка к OSMR можно приготовить в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества, такие как сахарозу.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть предназначены для парентеральной доставки. В альтернативном варианте композиции могут быть предназначены для доставки через

пищеварительный тракт, например пероральной. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций относится к данной области техники. Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые являются приемлемыми, учитывая место введения. В определенных вариантах реализации изобретения для поддержания в композиции физиологического уровня pH или чуть более низкого pH, как правило, в пределах диапазона от около 5 до около 8, используют буферы.

Если предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции для применения в данном изобретении могут находиться в форме апиrogenного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего необходимый антигенсвязывающий белок к OSMR в фармацевтически приемлемом наполнителе. Самым подходящим наполнителем для парентеральной инъекции является дистиллированная вода с растворенным в ней антигенсвязывающим белком к OSMR в виде стерильного, изотонического раствора, сохраняемого должным образом. В определенных вариантах реализации изобретения приготовление может включать соединение необходимой молекулы с агентом, таким как инъеклируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечить контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством депо-инъекции. В определенных вариантах реализации изобретения также можно использовать гиалуроновую кислоту, которая оказывает эффект, состоящий в продлении времени нахождения в системе кровообращения. В определенных вариантах реализации изобретения можно использовать имплантируемые устройства для доставки лекарственного препарата для внесения необходимого антигенсвязывающего белка.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть получены для ингаляции. В таких вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие белки к OSMR предпочтительно готовят в виде сухого, ингалируемого порошка. В конкретных вариантах реализации изобретения ингаляционные растворы антигенсвязывающего белка к OSMR можно готовить с пропеллентом для аэрозольной доставки. В определенных вариантах реализации изобретения растворы могут быть распыляемыми. Ингаляционное введение и способы приготовления соответствующих лекарственных составов дополнительно описаны в международной патентной заявке № PCT/US94/001875, которая включена посредством ссылки и описывает ингаляционную доставку химически модифицированных белков.

Также предполагается, что лекарственные составы можно вводить перорально. Антигенсвязывающие белки к OSMR, которые вводят этим путем, можно готовить с носителями или без носителей, традиционно применяемых для составления твердых дозирочных форм, таких как таблетки и капсулы. В определенных вариантах реализации изобретения капсула может быть получена таким образом, чтобы происходило высвобождение активной части состава в точке желудочно-кишечного тракта с максимальной биодоступностью и минимальным пресистемным распадом. Можно включать дополнительные агенты, чтобы облегчить всасывание антигенсвязывающего белка к OSMR. Также модно применять разбавители, ароматизаторы, низкоплавкие воски, растительные масла, лубриканты, суспендирующие агенты, агенты для улучшения распадаемости таблеток и связующие вещества.

Существование дополнительных фармацевтических композиций очевидно для специалистов в данной области техники, включая составы, содержащие антигенсвязывающие белки к OSMR в составах с замедленной или контролируемой доставкой. Также специалистам в данной области техники известны способы получения большого количества других средств замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, которая включена посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут содержать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Матрицы для замедленного высвобождения могут содержать полиэферы, гидрогели, полилактиды (как раскрыто в патенте США № 3773919 и Европейской патентной заявке № EP 058481, которые включены посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers*, 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (Европейская патентная заявка № EP 133988). Также композиции с замедленным высвобождением могут содержать липосомы, которые можно получить любым из нескольких известных в данной области техники методов. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; Европейские патентные заявки № EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, применяемые для *in vivo* введения, как правило, находятся в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно осуществлять посредством фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. При лиофилизации композиции стерилизацию, использующую этот метод, можно проводить как до, так и после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции в общем случае помещают в контейнер со стерильным отверстием для доступа, например, в пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой гиподермической иглой для инъекций.

Аспекты изобретения включают самобуферизующиеся составы антигенсвязывающего белка к OSMR, которые можно применять как фармацевтические композиции, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Как обсуждалось выше, в определенных вариантах реализации изобретения предложены композиции антигенсвязывающих белков к OSMR, в частности фармацевтические композиции антигенсвязывающих белков к OSMR, которые содержат, кроме антигенсвязывающего белка к OSMR, одно или более вспомогательных веществ, таких как те, которые иллюстративно описаны в данном разделе и в другом месте данного документа. Вспомогательные вещества можно использовать в рамках данного изобретения в многочисленных целях, таких как корректировка физических, химических или биологических свойств составов, такая как корректировка вязкости, и/или в способах согласно изобретению для улучшения эффективности и/или для стабилизации таких составов и способах избежать разложения и порчи вследствие, например, нагрузок, которые возникают во время производства, перевозки, хранения, предварительного приготовления препарата, введения и т.д.

Доступно большое количество руководств по стабилизации белков и материалов составов, а также методов, применяемых в этих целях, например Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations", *Pharm. Res.* 8(3):285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" in *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13:61-84 (2002) и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", *Pharm. Biotechnol.* 13:159-75 (2002), которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки, в частности те части, которые касаются вспомогательных веществ и связанных с ними способов для самобуферизующихся белковых составов в соответствии с настоящим изобретением, в особенности белковых фармацевтических продуктов и способов для применения в ветеринарии и/или медицине человека.

В соответствии с определенными вариантами реализации изобретения можно применять соли, например, чтобы корректировать ионную силу и/или изотоничность состава и/или улучшать растворимость и/или физическую стабильность белка или другого ингредиента композиции в соответствии с изобретением.

Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков посредством связывания с заряженными остатками на поверхности белка и посредством экранирования заряженных и полярных групп белка, а также снижения силы их электростатического взаимодействия, притяжения и отталкивания. Также ионы могут стабилизировать денатурированное состояние белка, в частности, посредством связывания с денатурированными пептидными связями (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может снижать межмолекулярное электростатическое взаимодействие и тем самым предотвращать или снижать агрегацию белка и нерастворимость.

Виды ионов существенно отличаются по воздействию, которое они оказывают на белки. Было разработано большое количество способов категоризации ионов и их воздействия на белки, которые можно применять при составлении фармацевтических композиций в соответствии с изобретением. Одним из примеров является ряд Гофмейстера, в котором ионные и полярные неионные растворимые компоненты выстроены в соответствии с их воздействием на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворимые компоненты называются "космотропными". Дестабилизирующие растворимые компоненты называются "хаотропными". Космотропы обычно применяют в высоких концентрациях (например, >1 моль/л сульфата аммония) для преципитации белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно применяют для денатурации и/или растворения белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении "высаливания" и "всаливания" определяет их позицию в ряде Гофмейстера.

В соответствии с разными вариантами реализации изобретения в составах антигенсвязывающего белка к OSMR можно использовать свободные аминокислоты в качестве объемобразующих агентов, стабилизаторов и антиоксидантов, а также в рамках других стандартных применений. Для стабилизации белков в составе можно использовать лизин, пролин, серин и аланин. Глицин применяют при лиофилизации, чтобы гарантировать надлежащую структуру и свойства таблетки. Аргинин можно использовать для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта.

Полиоли включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, а также многоатомные спирты, такие как, например, глицерол и пропиленгликоль и в целях обсуждения в данном документе полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные вещества. Полиоли являются космотропными. Их применяют в качестве стабилизирующих агентов как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физического и химического распада. Также полиоли применяют для корректировки тоничности составов.

Среди полиолов, применимых в выбранных вариантах реализации изобретения, находится маннит, обычно применяемый, чтобы обеспечивать структурную стабильность таблетки в лиофилизированных

составах. Он обеспечивает структурную стабильность таблетки. Обычно его применяют вместе с лиопротектантом, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются одними из предпочтительных агентов для корректировки тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от нагрузок, связанных с замораживанием-размораживанием во время транспортировки или приготовлением больших объемов препарата во время производственного процесса. Снижение количества сахаров (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), таких как глюкоза и лактоза, может гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, в общем случае они не относятся к предпочтительным полиолам для применения в соответствии с изобретением. Кроме того, сахара, которые относятся к таким реактивным видам, как сахароза, которая гидролизуется до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и, соответственно, несет риск гликирования, также не относятся к предпочтительным полиолам согласно изобретению. ПЭГ применяют для стабилизации белков и в качестве криопротектанта, поэтому в этом отношении его можно применять в данном изобретении.

Варианты реализации составов антигенсвязывающего белка к OSMR дополнительно включают сурфактанты. Молекулы белков могут быть восприимчивы к адсорбции на поверхностях и к денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка. Эти вредные взаимодействия в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка и, как правило, усиливаются вследствие физической тряски, такой, которая возникает во время транспортировки и эксплуатации продукта.

Сурфактанты традиционно используют, чтобы предотвратить, минимизировать или снизить адсорбцию на поверхности. Применимые в данном изобретении сурфактанты включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие эфиры жирных кислот сорбитан полиэтоксилатов, а также полоксамер 188.

Также сурфактанты традиционно используют, чтобы регулировать конформационную стабильность белка. Применение сурфактантов в этих целях является белок-специфичным, так как любой заданный сурфактант, как правило, будет стабилизировать одни белки и дестабилизировать другие.

Полисорбаты восприимчивы к окислительному разрушению и часто содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей остатков белка, в особенности метионина. Следовательно, полисорбаты нужно применять осторожно, и в случае применения - в самой низкой эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты иллюстрируют общее правило, что вспомогательные вещества нужно применять в самой низкой эффективной концентрации.

Варианты реализации составов антигенсвязывающего белка к OSMR дополнительно включают один или более антиоксидантов. Вредное окисление белков в фармацевтических составах можно в некоторой степени предотвратить путем поддержания соответствующих уровней внешнего кислорода и температуры и избегая воздействия света. Также для предотвращения окислительного разрушения белков можно использовать вспомогательные антиоксиданты. К полезным в этом отношении антиоксидантам относятся восстановительные агенты, ловушки кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых составах в соответствии с изобретением предпочтительно растворимы в воде и сохраняют свою активность на протяжении срока хранения продукта. В этом отношении предпочтительным антиоксидантом в соответствии с изобретением является ЭДТА.

Антиоксиданты могут повредить белок. Например, восстановительные агенты, такие как, в частности, глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Следовательно, антиоксиданты для применения в изобретении выбирают так, чтобы, помимо прочего, устранить или существенно снизить возможность повреждения ими белков в составах.

Составы в соответствии с изобретением могут содержать ионы металлов, которые являются кофакторами белков и необходимы для образования белковых координационных комплексов, например цинка, который необходим для образования определенных инсулиновых суспензий. Также ионы металлов могут ингибировать некоторые процессы, которые приводят к разрушению белков. При этом ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые приводят к разрушению белков.

Для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты можно использовать ионы магния (10-120 мМ). Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут повышать стабильность человеческой дезоксирибонуклеазы. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут дестабилизировать рчДНКазу. Аналогично, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать VIII, но он может быть дестабилизирован Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , а его агрегация может быть усилена ионами Al^{+3} .

Варианты реализации составов антигенсвязывающего белка к OSMR дополнительно включают один или более консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых парентеральных составов, которые предусматривают более одного набора из одного и того же контейнера. Их основной функцией является ингибирование роста бактерий и обеспечение стерильности продукта на протяжении времени хранения или срока годности лекарственного продукта. Традиционно используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю применения с низкомолекулярными парентеральными средствами, при разработке белковых составов, которые содержат консерванты, могут возникнуть трудности. Консерванты практически всегда оказывают деста-

билизирующее воздействие (приводящее к агрегации) на белки, и это стало основным фактором в ограничении их применения в многодозовых белковых составах. На сегодняшний день большинство белковых лекарственных препаратов готовят только для однократного применения. Однако, в случае если возможны многодозовые составы, их преимуществом является удобство для пациента и повышенная конкурентоспособность. Хорошим примером является пример человеческого гормона роста (hGH), в случае которого разработка содержащих консерванты составов привела к промышленному внедрению более удобного многодозового шприца-ручки. По меньшей мере четыре таких устройства, содержащих составы hGH с консервантами, доступны на сегодняшний день на рынке. Нордитропин (жидкость, Novo Nordisk), Нутропин AQ (жидкость, Genentech) и Генотропин (лиофилизированная форма, двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Соматроп (Eli Lilly) приготовлен с м-крезолом.

Во время составления и разработки содержащих консерванты дозировочных форм нужно учитывать некоторые аспекты. Необходимо оптимизировать эффективную концентрацию консерванта в лекарственном продукте. Для этого необходимо проведение тестирования заданного консерванта в дозировочной форме в диапазоне концентраций, который обеспечивает антибактериальную эффективность и не оказывает негативного влияния на стабильность белка.

Как можно было ожидать, разработка жидких составов, содержащих консерванты, сталкивается с большими трудностями, чем разработка лиофилизированных составов. Прошедшие сухую заморозку продукты можно лиофилизировать без применения консервантов и восстанавливать в содержащем консерванты разбавителе во время применения. Это снижает количество времени, на протяжении которого консервант находится в контакте с белком, что существенно минимизирует риск нарушения стабильности. В случае жидких составов эффективность консерванта и стабильность нужно поддерживать на протяжении всего срока хранения продукта (от около 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна проявляться в конечном составе, содержащем активный лекарственный препарат и все вспомогательные компоненты.

В общем случае составы антигенсвязывающего белка к OSMR разрабатывают для определенных путей и способов введения, для определенных дозировок введения и частоты введения, для определенных видов лечения определенных заболеваний с разными диапазонами биодоступности и переносимости. Таким образом, составы можно разрабатывать в соответствии с изобретением для доставки любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, ушной, глазной, ректальный и вагинальный, а также парентеральные пути, включая внутривенную и внутриартериальную инъекцию, внутримышечную инъекцию и подкожную инъекцию.

После приготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить как в готовой для применения форме, так и в форме (например, лиофилизированной), которую необходимо восстанавливать перед введением. Также в изобретении предложены наборы для получения единичной дозы для введения. Наборы согласно изобретению могут содержать первый контейнер, содержащий сухой белок, и второй контейнер, содержащий водный состав. В определенных вариантах реализации изобретения предложены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

Терапевтически эффективное количество применяемой фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок к OSMR, зависит, например, от терапевтического контекста и целей. Для специалиста в данной области техники очевидно, что соответствующие дозировочные уровни для проведения лечения будут варьироваться частично в зависимости от доставляемой молекулы, показания, в связи с которым применяется антигенсвязывающий белок к OSMR, пути введения и размера (массы тела, площади поверхности тела и размера органов) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. В определенных вариантах реализации изобретения лечащий врач может титровать дозировку и модифицировать путь введения, чтобы обеспечить оптимальный терапевтический эффект. Типичная дозировка может соответствовать диапазону от около 0,1 мкг/кг до около 30 мг/кг или более в зависимости от вышеуказанных факторов. В конкретных вариантах реализации изобретения дозировка может соответствовать диапазону от около 0,1 мкг/кг до около 20 мг/кг, необязательно, от 10 мкг/кг до около 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до около 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего белка к OSMR предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или продолжительности бессимптомных периодов или предотвращению развития ухудшения или неспособности вследствие поражения болезнью.

Фармацевтические композиции можно вводить при помощи медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163, включенных в данный документ посредством ссылки.

Способы диагностирования или лечения связанного с OSMR заболевания или нарушения.

Антигенсвязывающие белки к OSMR согласно изобретению исключительно полезны для выявления OSMR в биологическом образце. В определенных вариантах реализации изобретения биологический образец, полученный от пациента, приводят в контакт с антигенсвязывающим белком к OSMR. Затем выявляют связывание антигенсвязывающего белка к OSMR с OSMR, чтобы определить наличие или относительное количество OSMR в образце. Такие способы можно применять в диагностировании или выявлении пациентов, поддающихся лечению антигенсвязывающим белком к OSMR.

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR согласно изобретению применяют для диагностирования, выявления или лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или заболевания, связанного с накоплением или перестройкой внеклеточного матрикса.

При лечении этих заболеваний антигенсвязывающий белок к OSMR может быть нацелен на экспрессирующие OSMR клетки иммунной системы для разрушения и/или может блокировать взаимодействие OSMR с OSM и/или IL-31.

Заболевания и нарушения, которые связаны с OSMR-опосредуемым сигналингом, исключительно восприимчивы к лечению одним или более антигенсвязывающими белками к OSMR, раскрытыми в данном документе. Такие нарушения включают, но не ограничиваются этим, воспаление, боль, прурит, узловатую чесуху, дерматит, астму, аутоиммунное заболевание, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хрящевой ткани, фиброз (включая, но не ограничиваясь этим, фиброз легких и фиброз кожи), фиброзирующие болезни, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), интерстициальный пневмонит, аномальное накопление коллагена, системный кожный амилоидоз, первичный кожный амилоидоз, болезнь Бехчета, назальный полипоз, цирроз печени, разрушение хрящевой ткани, разрушение костной ткани, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, пауциартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системным началом, ювенильный анкилозирующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативной энтезопатии и артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориагический артрит, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, пауциартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, ревматоидный артрит с системным началом, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативной энтезопатии и артропатии), дерматомиозит, псориагический артрит, склеродермию, ассоциированное со склеродермией интерстициальное заболевание легких, васкулит, миелит, полиомиелит, дерматомиелит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склеродермию, склероз, первичный склероз желчных протоков, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, пятнистый псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, atopический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), миастению гравис, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), болезнь Крона, язвенный колит, глютенную болезнь, множественный склероз (МС), астму, ХОЗЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофагит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет типа I, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, БТПХ, отторжение при трансплантации, повреждение почек, сердечнососудистое заболевание, инфекцию, сепсис, ВИЧ-инфекцию, травму, аллотрансплантатную нефропатию, IgA нефропатию, диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, атрезию желчевыводящих путей, застойную сердечную недостаточность, атеросклероз, рестеноз, лучевой фиброз, индуцированный химиотерапией фиброз, ожоги, хирургическую травму, гломерулосклероз и тому подобное.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или заболевание, связанное с накоплением или перестройкой внеклеточного матрикса, представляет собой фиброз, разрушение хрящевой ткани, артрит, ревматоидный артрит, склеродермию, ассоциированное со склеродермией интерстициальное заболевание легких, идиопатический легочный фиброз, цирроз, псориаз, atopический дерматит, системный кожный амилоидоз, первичный кожный амилоидоз, воспаление, зудящее воспаление, узловатую чесуху и боль.

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий белок к OSMR применяют для диагностирования, выявления или лечения рака или онкогенного нарушения. При лечении рака или онкогенного нарушения антигенсвязывающий белок к OSMR может быть нацелен на экспрессирующие OSMR клетки для разрушения и/или может блокировать взаимодействие OSMR с OSM и/или IL-31, тем самым снижая опосредуемый OSMR сигналинг. Предполагается, что антигенсвязывающие белки к OSMR, которые блокируют OSM- и/или IL-31-опосредуемый сигналинг, могут оказаться полезными для улучшения выживаемости среди раковых пациентов. Рак или онкогенные нарушения, которые можно диагностировать, выявлять или лечить при помощи антигенсвязывающего белка к OSMR, включают, но не ограничиваются этим, солидные опухоли в широком понимании, рак легких, рак яичников, рак молочной железы, рак простаты, рак эндометрия, рак почек, рак пищевода, рак поджелудочной железы,

плоскоклеточную карциному, увеальную меланому, рак шейки матки, рак ободочной и прямой кишки, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак поджелудочной железы, рак головы, рак шеи, рак печени, лейкемию, лимфому и болезнь Ходжкина, множественную миелому, меланому, рак желудка, астроцитому, рак желудка и аденокарциному легких.

Антигенсвязывающие белки можно применять для подавления роста опухоли, прогрессирования и/или появления метастаз. Такое подавление можно отслеживать разными способами. Например, подавление может привести и снижению размера опухоли и/или снижению метаболической активности в опухоли. Оба эти параметра определяют, например, при помощи МРТ или ПЭТ сканирования. Подавление также можно отслеживать по биопсии, чтобы установить уровень некроза, гибели опухолевых клеток и уровень наличия кровеносных сосудов в опухоли. Степень распространения метастаз можно определить известными способами.

В контексте данного документа использование любого или всех примеров или сравнительных выражений (например, "такой как") предназначено для лучшего понимания вариантов реализации изобретения и не ограничивает объем изобретения, если не указано иное. Никакие формулировки в тексте описания не следует считать такими, которые определяют какой-либо элемент, не указанный в формуле изобретения, как существенный для практической реализации изобретения.

Примеры

Следующие примеры, как практические, так и прогностические, приведены в целях иллюстрации определенных вариантов реализации и признаков настоящего изобретения и не ограничивают его объем.

Пример 1: Получение анти-OSMR антител при помощи платформы XENOMOUSE®

Полностью человеческие антитела, направленные против человеческого OSMR, получали, применяя технологию XENOMOUSE® (как описано в патентах США № 6114598; 6162963; 6833268; 7049426; 7064244, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки; и в Green et al., Nature Genetics, 7:13-21, 1994; Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-56; 1997; Green et al., J. Ex. Med. 188:483-95, 1998 и Kellermann et al., Current Opinion in Biotechnology, 13:593-7, 2002).

Чтобы получить антитела к OSMR, два разных штамма животных XENOMOUSE®, т.е. мышей XMG2-KL и XMG4-KL, иммунизировали человеческими растворимыми белками OSMR-Fc (полученными Amgen, Seattle, WA). Подходящее количество иммуногена (т.е. 10 мкг/мышь растворимого человеческого белка OSMR-Fc) использовали для первичной иммунизации животных XENOMOUSE® в соответствии со способами, раскрытыми в заявке на патент США № 08/759620, опубликованной 3 декабря 1996 г., и международных патентных заявках № WO 98/24893, опубликованной 11 июня 1998 г., и WO 00/76310, опубликованной 21 декабря 2000 г., описание которых включено в данный документ посредством ссылки. После первичной иммунизации последующие вторичные иммунизации иммуногеном (пять мкг/мышь растворимого человеческого белка OSMR-Fc) проводили согласно схеме и на протяжении времени, необходимого, чтобы индуцировать подходящий титр анти-OSMR антител у мышей.

Образцы сыворотки собирали приблизительно через четыре недели после первой инъекции и определяли специфические титры методом ELISA. Протокол, используемый для титрования животных XENOMOUSE®, был следующим: планшеты для связывания со средой Costar 3368 покрывали нейтралдином @ 8 мкг/мл (50 мкл/лунку) и инкубировали при 4°C в 1×ФСБ/0,05% азиде на протяжении ночи. Планшеты промывали, применяя 3 цикла промывки TiterTek обратноосмотически обессоленной водой. Планшеты блокировали, используя 250 мкл 1×ФСБ/1% молоко и инкубировали на протяжении по меньшей мере 30 мин при КТ. Блок вымывали, применяя 3 цикла промывки TiterTek обратноосмотически обессоленной водой. Далее проводили захват биотинилированного huOSMR-FN3H (полученного Amgen, Seattle, WA) в концентрации 2 мкг/мл в 1×ФСБ/1% молоке/10 mM Ca²⁺ (аналитический разбавитель), 50 мкл/лунку и инкубировали на протяжении 1 ч при КТ. Затем проводили промывку, применяя 3 цикла промывки TiterTek обратноосмотически обессоленной водой. В случае первичных антител образцы сыворотки титровали 1:3 в двух экземплярах от 1:100. Это делали в аналитическом разбавителе, 50 мкл/лунку, и инкубировали на протяжении 1 ч при КТ. Затем проводили промывку, применяя 3 цикла промывки TiterTek обратноосмотически обессоленной водой. Вторичное антитело представляло собой козий античеловеческий IgG Fc HRP @, 400 нг/мл в аналитическом разбавителе при 50 мкл/лунку. Его инкубировали на протяжении 1 ч при КТ. Затем проводили промывку, применяя 3 цикла промывки TiterTek обратноосмотически обессоленной водой, и высушивали при помощи бумажных полотенец. Для субстрата использовали одностадийный раствор ТМБ (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 мкл/лунку) и давали субстрату сформироваться на протяжении 30 мин при КТ.

Определяли животных, демонстрировавших подходящие титры. Было выявлено пять животных XMG2KL со специфическим иммунным ответом IgG на OSMR. У этих животных вырезали селезенку и дренажные лимфатические узлы и объединяли для получения гибридомы. Образцы тканей от пяти животных XMG4KL со специфическими иммунными ответами собирали аналогичным способом и готовили для проведения отдельного скринингового исследования со слиянием. Обогащенные В-клетки, полученные от иммунных животных, сливали с несекреторными клетками миеломы P3×63Ag8.653 (Американ-

ская коллекция типовых культур CRL-1580; Kearney et al., J. Immunol. 123:1548-50, 1979), чтобы получить гибридомы при помощи стандартных методов (Kohler et al., Nature, 256, 495-7, 1975).

Затем гибридомы высевали при высокой плотности (множественные разные гибридомные клоны на лунку) в 96-луночные планшеты для тканевого культивирования и выращивали на протяжении четырех недель. Супернатанты гибридомных линий исследовали в отношении связывания с полноразмерным OSMR человека и яванского макака, экспрессируемым временно трансфицированными клетками 293Т, при помощи флуориметрического микрообъемного метода анализа (FMAT) (Applied Biosystems, Foster City, CA). Вкратце, в 384-луночные планшеты FMAT смешивали 40 мкл смеси из 3000 OSMR-трансфицированных клеток 293Т и 15000 парентеральных клеток 293Т с 15 мкл гибридомного супернатанта и 10 мкл меченого античеловеческой легкой цепью (ч-каппа/ч-лямбда) Alexa647 (Invitrogen, Carlsbad, CA) вторичного антитела (1,0 мкг/мл в конечной концентрации). Затем планшеты инкубировали на протяжении 3 ч при комнатной температуре и считывали флуоресценцию, используя FMAT-ридер. Эти исследования позволили выявить 885 гибридомных линий, которые связываются с OSMR как человека, так и яванского макака.

Пример 2. Анализ блокирования OSMR человека.

Определяли способность антител к OSMR блокировать сигналинг через человеческий OSMR, используя два этапа анализа с человеческим онкостатином М (OSM) или человеческим интерлейкином 31 (IL-31) в качестве лиганда. Вместе, данный анализ применяли для определения того, могут ли антитела ингибировать сигналинг OSMR, индуцируемую связыванием OSM и/или IL-31.

В первом исследовании антитела оценивали в отношении их способности блокировать сигналинг OSM через OSMR. Стимуляция первичных нормальных человеческих легочных фибробластов OSM индуцирует фосфорилирование STAT3 и его последующую транслокацию в ядро. Клетки высевали в количестве 3000 клеток/лунку в 384-луночные планшеты Costar и давали возможность закрепиться на протяжении ночи. Клетки предварительно обрабатывали на протяжении 20 мин супернатантом антител, а затем стимулировали 80 пМ человеческого OSM на протяжении 30 мин.

Затем клетки промывали 3X в ФСБ, фиксировали в 3,5% растворе формальдегида, промывали (3X в ФСБТ) и пермеабелизировали раствором 0,5% Тритон X-100. Затем клетки окрашивали анти-фосфо-STAT3 антителом на протяжении 1 ч, промывали и окрашивали конъюгированным антителом AlexaFluor (все из набора HitKit от Celloomics). Планшеты покрывали и считывали при помощи устройства ArrayScan, используя собственный алгоритм Celloomics для генерации величины ядерной интенсивности и величины цитоплазматической интенсивности. Результаты представляли в виде разницы между этими двумя величинами и дополнительно нормировали относительно контрольных данных, включающих максимально стимулированные клетки и обработанные средой клетки (POC).

Во втором исследовании антитела оценивали в отношении их способности ингибировать пролиферативный сигнал IL-31 через OSMR в стабильной клеточной линии со сверхэкспрессией IL-31RA4 и OSMR. Клетки BaF3 стабильно трансфицировали двумя плазмидами: pcDNA3.1 + huOSMRb (NeoR) и pcDNA3.1 + huIL31RA4 (ZeoR). В отсутствие мышиного IL-3 эта клеточная линия способна только пролиферировать в ответ на человеческий IL-31 и, следовательно, может быть использована специально для оценки блокирующей способности анти-OSMR антител. Клетки BaF3 высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 20000 клеток/лунку. Антитела и лиганд (huIL-31, Peprotech) добавляли в лунки до достижения конечного объема в 100 мкл, а планшеты инкубировали на протяжении 72 ч во влажной камере при 5% CO₂, 37C. После инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл аламара синего, а планшеты возвращали в инкубатор. Планшеты считывали на планшет-ридере Molecular Devices Vmax (570-600 нм) в разные временные точки после добавления аламара синего.

Результаты двух анализов представлены ниже в табл. 4. На этих двух этапах анализа в отношении блокирующей способности исследовали более 3000 гибридомных супернатантов; 200 наиболее сильных блокаторов дополнительно исследовали в ходе 4-точечного титрования, после чего 14 были выбраны для выработки рекомбинантного белка и дополнительного исследования. Величины IC₅₀ для трех типовых антител (антитела 1-3) приведены для обоих этапов анализа. Некоторые антитела ингибировали OSM-индуцированную транслокацию STAT3 в большей степени, чем они ингибировали IL-31-индуцированную пролиферацию, и наоборот. При этом все три антитела являлись эффективными ингибиторами OSM- и IL-31-опосредуемого сигналинга.

Таблица 4

IC50	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	157 пМ	252 пМ	1,35 нМ
IL-31	35,2 пМ	27,6 пМ	780 пМ

Пример 3. Анализ блокирования OSMR яванского макака.

Исследовали способность антител к OSMR блокировать сигналинг через OSMR яванского макака, используя два этапа анализа с человеческим OSM или человеческим IL-31 в качестве лиганда.

В первом исследовании антитела оценивали в отношении их способности блокировать сигналинг

OSM через OSMR яванского макака, используя линию первичных эпителиальных клеток почек. Стимуляция этих клеток OSM яванского макака (суно) индуцирует фосфорилирование STAT3 и его последующую транслокацию в ядро. Клетки высевали в количестве 3000 клеток/лунку в 384-луночные планшеты Costar и давали возможность закрепиться на протяжении ночи. Клетки предварительно обрабатывали на протяжении 20 мин супернатантом антител, а затем стимулировали 80 пМ OSM яванского макака на протяжении 30 мин. Затем клетки промывали 3X в ФСБ, фиксировали в 3,5% растворе формальдегида, промывали (3X в ФСБТ) и пермеабилizировали раствором 0,5% Тритон X-100. Затем клетки окрашивали анти-фосфо-STAT3 антителом на протяжении часа, промывали и окрашивали конъюгированным антителом AlexaFluor (все из набора HitKit от Cellomics). Планшеты покрывали и считывали при помощи устройства AggruScan, используя собственный алгоритм Cellomics для генерации величины ядерной интенсивности и величины цитоплазматической интенсивности. Результаты представляли в виде разницы между этими двумя величинами и дополнительно нормировали относительно контрольных данных, включающих максимально стимулированные клетки и обработанные средой клетки (РОС).

Во втором исследовании антитела оценивали в отношении их способности ингибировать пролиферативный сигнал IL-31 через OSMR яванского макака в стабильной клеточной линии со сверхэкспрессией IL-31RA4 и OSMR яванского макака. Как и в примере 2, клетки VaF3 высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 20000 клеток/лунку. Антитела и лиганд (huIL-31 яванского макака, внутренний, т.е. от Amgen, Seattle, WA) добавляли в лунки до достижения конечного объема в 100 мкл, а планшеты инкубировали на протяжении 72 ч во влажной камере при 5% CO₂, 37°C. После инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл аламара синего, а планшеты возвращали в инкубатор. Планшеты считывали на планшет-ридере Molecular Devices Vmax (570-600 нм) в разные временные точки после добавления аламара синего.

Результаты двух анализов представлены в табл. 5 с величинами IC₅₀ для обоих этапов анализа. Результаты подтверждают, что антитела 1, 2 и 3 являются эффективными ингибиторами OSM- и IL-31-опосредуемого сигналинга.

Таблица 5

IC50	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	1,26 нМ	518 пМ	1,24 нМ
IL-31	225 пМ	29,3 пМ	6,87 нМ

Пример 4. Сортировка эпитопов анти-OSMR антител.

Исследования конкурентирования антител проводили для того, чтобы получить характеристики эпитопов анти-OSMR антител у ксеномышей. Можно считать, что антитела, которые конкурируют друг с другом, связываются с одним и тем же участком на мишени. В этих экспериментах проводили захват антител к OSMR или нерелевантных антител на покрытых стрептавидином гранулах Lumipex, предварительно связанных с захватывающим антителом (биотинилированным моновалентным мышинным античеловеческим антителом IgG Fc). В лунки добавляли антиген OSMR или буфер (не содержащий антигена), после чего в каждую лунку добавляли пробное антитело и проводили выявление при помощи PE-меченого моновалентного мышинного античеловеческого антитела IgG Fc. Для каждой лунки измеряли среднюю интенсивность флуоресценции. Полное описание см. в Jia et al., J. Immunol. Methods, 288:91-8, 2004. Выявление флуоресценции в заданной лунке свидетельствовало о том, что пробное антитело было способно связываться с OSMR даже в присутствии другого антитела к OSMR, демонстрируя то, что они связываются с разными эпитопами. Было обнаружено как минимум три группы, как показано в табл. 6.

Таблица 6

Группа 1	Ab4
Группа 2	Ab1, Ab2, Ab3, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12 и Ab13
Группа 3	Ab14

Пример 5. Определение аффинности анти-OSMR антител.

Определяли аффинность анти-OSMR антител. Проводили определение кинетических констант скорости, чтобы исследовать взаимодействие антител 1-3 (Ab 1-3) с человеческим OSMR.

Биосенсорный анализ проводили при 25°C в буферной системе HBS-EP+ (1X) (10 мМ ГЭПЭС, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3,0 мМ ЭДТА, 0,05% сурфактанта P20), используя оптический биосенсор Biacore 3000, оборудованный сенсорным чипом CM5. До инъекции все реагенты хранили при 8°C. Козий античеловеческий IgG (Jackson ImmunoResearch, №109-005-098) иммобилизовали (~3000 KE) на сенсорном чипе посредством стандартного аминного сопряжения с проточными кюветами 1 и 2, а затем блокировали этаноламином. hOSMR.FH готовили в рабочем буфере при 150 нМ и 3-кратно разводили до 0,617 нМ. Антитела 1-3 разводили (от 0,25 до 0,5 мкг/мл) в рабочем буфере. Антитела инъецировали (15 мкл) через проточную кювету 2 при скорости потока 10 мкл/мин. Было захвачено около 50 KE антител. Поверхно-

сти давали время стабилизироваться (90 с), а затем каждую концентрацию (150, 50,0, 16,7, 5,56, 1,85 и 0,617) hOSMR проводили через проточные кюветы 1 и 2 при скорости потока 50 мкл/мин, чтобы наблюдать ассоциацию (5 мин) и диссоциацию (5 мин). Образцы исследовали в двух экземплярах в случайном порядке.

Пустой, не содержащий аналита буфер (0 нМ hOSMR) инъецировали до, в промежутке и после инъекций образцов. Антитела инъецировали (15 мкл) через проточную кювету 2 при скорости потока 10 мкл/мин. Было захвачено около 50 КЕ антител. Поверхности давали время стабилизироваться (90 с), а затем каждую концентрацию (150 нМ) hOSMR проводили через проточные кюветы 1 и 2 при скорости потока 50 мкл/мин, чтобы наблюдать ассоциацию (5 мин) и диссоциацию (1-2 ч). Образцы исследовали в трех экземплярах.

Пустой, не содержащий аналита буфер (0 нМ hOSMR) инъецировали до и после инъекций образцов. Поверхность восстанавливали при скорости потока 50 мкл/мин двумя инъекциями 10 мМ глицина (рН 1,5, 50 мкл). После этого проводили инъекцию пустого буфера (15 с).

Данные анализировали при помощи программного обеспечения Scrubber 2.0 следующим образом. Данные по проточной кювете 2 вычитали из данных по проточной кювете 1 (пустой стандарт). Затем данные с вычтенным стандартом (2-1) вычитали (двойная стандартизация) из самых близких данных для концентрации 0 нМ. После двойной стандартизации данные по длительной диссоциации аппроксимировали 1:1 моделью связывания, чтобы определить константу скорости диссоциации (k_d). Эту константу скорости диссоциации применяли в качестве фиксированного параметра для аппроксимации данных по кратковременной диссоциации после двойной стандартизации 1:1 моделью связывания, чтобы определить константу скорости ассоциации (k_a) и равновесную константу диссоциации (K_d).

В экспериментальных условиях поведение реагентов было нормальным, а данные (см. табл. 7) хорошо аппроксимировались 1:1 моделью связывания.

Таблица 7

Антитело	Антиген	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (пМ)
Ab1	huOSMR	$4,47 \times 10^5$	$9,95 \times 10^{-5}$	221
Ab2	huOSMR	$5,50 \times 10^5$	$1,81 \times 10^{-5}$	32,7
Ab3	huOSMR	$9,47 \times 10^4$	$1,02 \times 10^{-4}$	1080

Пример 6. Анти-OSMR антитела.

Получали полностью человеческие антитела, направленные против человеческого OSMR, используя технологию XENOMOUSE®, описанную выше в примере 1. Было продемонстрировано, что все антитела 1, 2 и 3 являлись эффективными ингибиторами OSM- и/или IL-31-опосредуемого сигналинга. Были определены последовательности антител 1, 2 и 3 (т.е. Ab1, Ab2 и Ab3), которые приведены в табл. 8.

Таблица 8

Описание	SEQ ID №:	Последовательность
Ab ₁ - Нуклеотид тяжелой цепи	3	caggtgcagctggcagctcgggctgaggtgaagaa gcctggggcctcagtgaaagtctctctgcaaggcttcg gatcaccllcaccagllalgalalcaacggglgca caggccactggacagggctcagtgatggatggat gaaccclaalagtgglacaacagactatgacagaagl tccagggcagagtcaccatgaccaggaacatttcata agcacggcctacattgagctgagcagcctgagatctga ggacacggccttatattactgtgcgagagataggtgg ctgcaatacagattactactctactacggtatggac gtctggggccaagggaaccaggtcaccgtctctcagc tagcaccgaaggcccatcggctctcccccggggcct gctccaggagcactccgagagcagcagcggcctgggc tgcttggtcaaggactacttcccgaaccgggtgacggt gtcgtggaactcagggcctcagaccagcgggtgcaca ccllccagctglcclacaglcclcaggactclactcc ctcagcagcgtggcagcgtgccctccagcaactcgg caccagacctacacctgcaacgtagatcacaagccca gcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgc aaatgt tgtgtcaggtgccaccgtgcccaaccacctgtggc aggaccgtcagctctctctctcccccaaaaccgaagg acacctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgc gtggtggtggacgtgagcccaagaccggggtcca gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg ccaagacaaagccacgggagggagcagttcaacagcacg ttccgtggtgacagctcctcaccgttggtcaccagga clggctgaaacggcaaggaglacaaaglgcaaggllcca aaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtglacac cctgccccatcccgggagagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagc gacatcggcgtggagtgaggagcaatgggcagccgga gaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccg

		<p>acggctcctctctctctacagcaagctcaccgtggac aaagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgccc cgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcaga agagcctctcctgtctccgggtaaa</p>
<p>Ab2 - Нуклеотид тяжелой цепи</p>	<p>4</p>	<p>caggtgcagctggcagctctggggctgaggtgaagaa gcctggggcctcagtgaaagtctcctgcaaggctctcg gatacacctcaccagttatgaaatcaactgggtgcga caggccactggacaagggetttagtgatggatggat gaaccclaacaglgglLacacaggctaLgcacagaagl tccagggcagagtcaccatgaccaggaacacctccata aqcacagcctacatggaatgaqcaagcctgagatctga ggacacggccgtgattactgtgcgagagatatagtgg ctgcgaatacggattactactctattatggtatggac gtctggggccaagggaaccaggtcacgctctcctcagc tagcaccaaaggcccatcggctctccccctggcgcct gctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggc tgcttggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggt gtcgtggaactcagggcctctgaccagcggcgtgcaca ccttcccagctgtcctacagtcctcagactctactcc ctcagcagcgtggcgaccgtgcctccagcaacttcgg caccacagcctacacctgcaacgtagatcacaaagccca gcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgt tgtgtcgagtgcaccacgtgccacgaccacctgtggc aggaccgtaglctctcclclccccccaaaaccacaagg acacctcaatgatctcccgaccctgaggtcaagtgc gtggtggtggcgtgagccacgaagaccccgaggtcca gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg ccaagacaaagccacggggagcagttcaacagcaccg tcccgctgtggtcagcgtcctcacgctgtgacaccagga ctggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaaaccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacac cctgccccalcccgggagagalgaccaagaaccagg tcagcctgacctgcctggtaaaagctcttaccaccagc gacatcgcctggagtgaggagcaatgggcagccgga</p>

		<p>gaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccg acggctccttcttctctacagcaagctcacctggac aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc cgtgatgcalgaggctctgcacaaccaclacacgcaga agagcctctccctgtctccgggtaaa</p>
<p>Ab3 - Нуклеотил тяжелой цепи</p>	<p>3</p>	<p>caggllcalctgggtgcagctcggagclgaggtgaagaa gcttggggcctcagtgaaaggtccctgcaaggctctg gttacacctttaccagctatggatcagctgggtgcga caggccctggacaagggttgagtggatgggatggct caqcacttacagtggtaacacaaactatgcacaqaagc tccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacg aqcacaqcctacatggagctgaqcaqccctgagatetga cgacacggccgtgtat:actgtgcgagagggaaactct actactacggtatggacgtctggggccaggggaccacg gtcaccgtctcctcagctagcaccgaaggcccatcggt ctteccctggggcccctgctccaggagcacctccgaga gcacagcggccclgggctgctgglaaaggacclacttc cccgaaccggtagcgggtgctggaactcaggcgtct gaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtctacagt cctcaggaactctactccctcagcagcgtggtgaccgtg cctccagcaacttcggcaccacagacctacacctgcaa cgtagatcacaagcccagcaacccaagtgqacaaga cagttgagcgcgaatgttgtgtcagtgcccaccgtgc ccagcaccacctgtggcaggaccgtcagctctctctct cccccaaaaccgaaggacacctcatgatctcccgga cccctgaggtcagctgcgtggtggtggacgtgagccac gaagaccccgagglccagllcaaclgglaoglggacgg cgtggaggtgcataatgccaaagcaaaagccacgggagg agcagllcaacagcagllccgtgllgglcagcgtctc accgttgtgcaccaggactggcgaacggcaaggagta caagtqcaaggtctccaacaaagccctcccagccccca tcgagaaaaacatctccaaaacaaagggcagccccga gaaccacaggtgtacacctgccccatcccggagga gatgacaaagaaccaggtcagcctgacctgctggtca aaggttctaccccagcgaatcccggtggatgggag</p>

		<p>agcaatgggcagccggagacaactacaagaccacacc tcccatgctggactccgacggctccttcttctctaca gcaagctcaccg-ggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca caaccactacacgcagaagagcclclccctglclccgg gtaaa</p>
Ab1 - Белок тяжелой цепи	6	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDINWVR QATGQGLEWMGMNPNNGNTDYAQKFQGRVTMTRNISI STAYIELSSLRSEDVAVYYCARDMVAANTDYYFYYGMD VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSCVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSNFGITQYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPTEKTI KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSEFFLYSKLTVD KSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Ab2 - Белок тяжелой цепи	7	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYEINWVR QATGQGLEWMGMNPNNGYTGAAQKFQGRVTMTRNISI STAYMEMSSLRSEDVAVYYCARDIVAANTDYYFYYGMD VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSNFGITQYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPTEKTI KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSEFFLYSKLTVD KSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Ab3 - Белок тяжелой цепи	8	<p>QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVR QAPGQGLEWMGWLSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTETST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARGNFYYGMDVWGQGT ITVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSCVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV</p>

		PSSNFGTQTYTCNVDHKFSNTKVDKTVERKCCVECPFC PAPPVAGPSVFLFPKPKDITLMIISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPRHNNYKTTTPMQLDSIGSEFLLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK
Ab1 - Варибельная область тяжелой цепи	9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSDINWVR QATGQGLEWMGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNISI STAYIEISSLRSEDTAVYYCARDMVAANTDYYFYYGMDV VWGQGTITVTVSS
Ab2 - Варибельная область тяжелой цепи	10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSDYEINWVR QATGQGLEWMGWMNPNSGYTGAAQKFQGRVTMTRNISI STAYMFMSSLRSEDTAVYYCARDIIVAANTDYYFYYGMDV VWGQGTITVTVSS
Ab3 - Варибельная область тяжелой цепи	11	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSYGISWVR QAPGQGLEWMGWLSTYSGNTNYAQKLGGRVTMTTDTST STAYMELRSLSRSDITAVYYCARGNYYGMDVWGQGTIT VTVSS
Ab1 - CDR1 тяжелой цепи	12	SYDIN
Ab2 - CDR1 тяжелой цепи	13	SYEIN
Ab3 - CDR1 тяжелой цепи	14	SYGIS
Ab1 - CDR2 тяжелой цепи	15	WMNPNSGNTDYAQKFQG
Ab2 - CDR2 тяжелой цепи	16	WMGWMNPNSGYTGAAQKFQG
Ab3 - CDR2 тяжелой цепи	17	WLSTYSGNTNYAQKLGQ
Ab1 - CDR3 тяжелой цепи	18	DMVAANTDYYFYYGMDV
Ab2 - CDR3 тяжелой цепи	19	DIVAANTDYYFYYGMDV

Ab3 - CDR3 тяжелой цепи	20	GNFYYYGMDV
Ab1 - Нуклеотид легкой цепи	21	<p>cagtctgtgctgactcagccaccctcagcatctgggac ccccgggcagagggtcaccatctctgttctggaagca gctccaacgtcggaagtaatactgtaagctggtaccaa cagctcccaggaacggcccccaactctcatctatac taataatggcggccctccggggtccctgaccgattct ctggctccaagtctggcaccctcagcctccctggccatc agtgggctccagctgaggatgaggtgattatttctg tgcagcgttagatgacagctgaaagggtggtattctg goggagggaccsaactgaccgtccctaggccaaccgaaa ggggcgccctcggctactctgttcccgccctcctctga ggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctca taagtgacltclacccgggagccgtgacagtgccctgg aaggcagatagcagcccgctcaaggcgggagtggagac caccacaccctccaaacaagcaacaacaagtacgcgg ccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaag tcccacagaagctacagctccaggtcagcatgaagg gagcaccglggagaagacagtgggccclacagaalgl ca</p>
Ab2 - Нуклеотид легкой цепи	22	<p>cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggac ccccgggcagagggtcaccatctctlgllctggaagca actccaacatcggaagtaatactgtcaactggtaccac cagctcccaggaacggcccccaactctcatctataa tattaataagcggccctcaggggtccctgaccgattct ctggctccaagtctggctcctcagcctccctggccatc agtgggctccagctgaggatgaggtgattattactg ttcaacatgggtgacagcctggaagggtggtattctg goggagggaccsaagctgaccgtccctaggccaaccgaaa ggggcgccctcggctactctgttcccgccctcctctga ggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctca taagtgacltctacccgggagccgtgacagtgccctgg aaggcagatagcagcccgctcaaggcgggagtggagac caccacaccctccaaacaagcaacaacaagtacgcgg ccagcagclactgagcctgacgcctgagcagtggaag</p>

		tcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagg gagcaccglggagaagacaglggcccclacagaalgll ca
Ab3 - Нуклеотид легкой цепи	23	gaaatttggttgacgcagctctccaggcaccctgtcttt gtctccaggggaagagccaccctctctgcagggcca gtcagaggttagcagcagctacttagcctgglaccag cagaaacctggccaggtcccaggtctctcatctttgg tgcttcagcagggccactggcatcccagacaggttca gtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatc agcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactg tcagcagtatggtagctcgccctccgatcaccttcggcc aagggaacagactggagattaaactgacgggtggctgca ccatctgtctctcatctcccgccaactgatgagcagtt gaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaata actlclalcccagagaggccaaaglacagtggaagglg gataacgcctccaactcgggtaactcccaggagagtg cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctca gcagcaccclgacgctgagcaaacgagactacgagaaa cacaagctcagcctgcgaagtcacccatcagggcct gagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagt gt
Ab1 - Белок легкой цепи	24	QSVLTQPPSASCTPGQRVTI SCSCSSSNVGSNTVSWYQ QLPGTAPKLLIYTNRRPFGVDRFSGSKSGTSASLAI SGLQSEDEADYFCAALDDSLNGVVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETITPSKQSNNKYAASSYLSTPEQWK SERSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab2 - Белок легкой цепи	25	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCSCSNSNIGSNVNWYH QLPGTAPKLLIYNINKRPSGVDRFSGSKSGSSASLAI SGIQSEDEADYFCSTWDDSLDGVVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETITPSKQSNNKYAASSYLSTPEQWK SERSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab3 - Белок легкой цепи	26	FIVLTQSPGTTISLSPGKRATISCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI

		SRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPITFGQGRLEIKRTVAA FSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYEPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKALYEK IKVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC
Ab1 - Вариабельный участок легкой цепи	27	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNVGSNTVSWYQ QLPGTAPKLLIYTNRRPFCVDPDRFSGSKSGTSASLAI SGLQSEDEADYFCAALDDSLNGVVFGGGTKLTVLG
Ab2 - Вариабельный участок легкой цепи	28	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYH QLPGTAPKLLIYNINKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAI SGLQSEDEADYFCSTWDDSLDGVVFGGGTKLTVLG
Ab3 - Вариабельный участок легкой цепи	29	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPITFGQGRLEIKR
Ab1 - CDR1 легкой цепи	30	SGSSSNVGSNTVS
Ab2 - CDR1 легкой цепи	31	SGSNSNIGSNTVN
Ab3 - CDR1 легкой цепи	32	RASQSVSSSYLA
Ab1 - CDR2 легкой цепи	33	TNRRRPS
Ab2 - CDR2 легкой цепи	34	NINKRPS
Ab3-CDR2 легкой цепи	35	GASSRAT
Ab1 - CDR3 легкой цепи	36	AALDDSLNGVV
Ab2 - CDR3 легкой цепи	37	STWDDSLDGVV
Ab3 - CDR3 легкой цепи	38	QQYGSSPPIT

Пример 7. Модифицированные анти-OSMR антитела.

Получали модифицированные версии Ab1, Ab2 и Ab3. В случае всех трех модифицированных форм антител удаляли лизин в С-конце тяжелой цепи. В случае Ab1 и Ab2 удаляли участок гликозилирования в позиции 73 путем замещения аспарагина 73 аспарагиновой кислотой. Эти варианты были названы Ab1-N73D и Ab2-N73D. Последовательности модифицированных антител приведены в табл. 9 (модифицированные нуклеотиды и аминокислоты подчеркнуты).

Таблица 9

Описание	SEQ ID №:	Последовательность
Ab1 версия 2 - Нуклеотид тяжелой цепи (N3D/C- терминальный лизин удален)	47	caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaa gcctggggcctcagtgaaagcctcctgcaaggcctcctg gatcacaccttcaccagttatgatatcaactgggtggga cagggccactggacaggggcttgagtggatgggatggat gaccctcctatgctggtaaccacagactatgcacagagct tccaggggcagagtcaccatgaccagggacatttccata agcacggcctacattgagctgagcagcctgagatctga ggacacggccgcttcttactctgctgagagatctgggg ctgggaatacggattactacttctactacggtaaggac gtctggggccaagggaaccaggtcacctctctccacagc tagcaccaaggggcccatcggtcttccccctggcgcct gctccaggagcacctccgagagcacacagcggccctgggc tgcttggtcaaggactacttccccgaaccggtgacgggt gtcgtggaactcagggcctctgaccagcggcgtgcaca cctccccagctgtcctacagtcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaactcggg caccacagacctacacctgcaacgtagatcacaaagccca gcaacaccaaggaggacaagacagttgagcgaatgt tgctgctgagtgcccaccgtgcccaaccacctgtggc aggaccgtcagctctctcttcccccaaaacccaagg acacctcatalgactctccggaccctgaggcaccglgc gtgggtggaggcgtgagccacgaagaccccgaggtcaca gttcaacaggtagctgagcggcgtggaggtcacaaatg ccaagacaaaqccacgggaaggagcttcaacagcagc

	<p>ttccgtgaggcagcgtcctcaccgttgaccaggga ctggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggctcca acaaaagccctcccagcccccacgagaaccatctcc aaaaccaaaaggcagcccccagagaaccacaggtgacac ctggcccccacccgggagagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgctggtaaaaggcttctaccccagc gacatcgcctggagtgggagagcaatgggcagccgga gaacaactacaagaccacacctcccattgctggactccg acggctcttcttctctacagcaagctcaccgaggac aagagcagglggcagcaggggaacgctctctcatgctc cgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcaga agagcctctcccgtctccgggt</p>
<p>Ab2 версия 2 - Нуклеотид тяжелой цепи (N/D/C- терминальный лизин удален)</p>	<p>48 caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaa gctggggcctcagtgaaggctctctgcaaggctctcg gatacaccttcccagttatgaaatcaactgggtggga caggccactggacaagggttgagtggatggatggat gaaccctaacagtggttacacaggctatgcacagaagt tccagggcagagtcaccatgaccagggacacctccata agcacagcctacatggaaatgagcagcctgagatctga ggacacggcctgtattactgtgcgagagatatagtgg ctgcgaatacggattactacttctattatggtatggac gtctggggccaagggaaccacggtcaccgtctcccagc tagcaccaggggcccatcggtcttccccctgggcacct gtcccaggagcaccctccgagagcagcggcccgggc tgcttggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggt gtcgtggaactcaggcgtcttgaccagcggcgtgcaca ccttcccagctgctctacagctctcaggaactctactcc ctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaactcgg caccacagcctacacctgcaacgtagalcaaacgcca gcaacacaaaggaggacaagacagttgagcgcacaatgt tggtcgagtgcccaccgtgccagcaccacctgtggc aggaccgtcagctctctcttcccccaaaaccgaag acaccctcatgactctccggaccctgaggtcacgtgc glgglggtggacglgagccacgaagaccccagglcca gttcaactggtagcgtggacggcgtgaggtgcataatg</p>

		<p>ccaagacaagccacgggaggagcagttcaacagcacg lcccgLgTggtcagcglccclcaccgllglgcaeccagga ctggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggctcca acaaaggcccccagcccccacgagaaaaccatctcc aaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtcac cctgcccccatcccggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgctggcacaaggcttctaccccagc gacatcgcctggaggggagagcaatgggcagccgga gaacaactacaagaccacaccccccagctggactccg acggctccttcttccctacagcaagctcaccgtggac aagagcaggggcagcaggggaacgtcttctcatgctc cgtgatgacagggcctgcaacaaccactacacgcaga agagccttcccgtctccgggt</p>
<p>Аб3 - Нуклеотид тяжелой цепи (С-терминальный лизин удален)</p>	<p>49</p>	<p>caqgttcactctggtgcagctctggagctgaggtgaqaa gcttggggcctcagtgaggctctcctgcaaggcttctg gttacaccttaccagctatggtaaccagctgggtgcga caggccccctggacaaggccttgagggatgggatggct cagcacttacagtggtaacacaaactatgcacagaagc tcaggggcagagaccacatgaccacagacacatccacg agcacagccacatggagctgaggagcctgagatctga cgcacagccctgtatctactgtccgagagggaaactct actactacggtaaggacgtctggggccaggggaccacg gtcacctgctcccagctagcaccaggcccatcgggt cttccccctgggcccctgctccaggagcacctccgaga gcacagcggccctgggctgctggccaaggactacttc cccgaaccgglgacgggtgctggaaclcaggcgtctct gaccagcggcgtgcacacctcccagctgtcttacagt cctcaggactctactcccacagcagcgtggtgaccgtg cctccagcaactcggcaccacagacctacacctgcaa cglagalcacaagcccagcaaccacaagglggacaaga cagttgagcgaatgttgtgctgagtgcccaccgtgc ccagcaccacctgtggcaggaccgcagcttctctctt cccccaaaacccaaggacacctcaatgatctccggga cccctgaggtcacgtgctggctggcagctgagccac gaagaccccagggtccagttcaactgggtacgtggacgg</p>

		<p>cgtggagggtgcataatgccaaagacaaagccacgggagg agcagllcaacagcagctccgglgglcagcgtccclc accgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagta caagtgcaagggtctccaacaaggctcccagccccca tcgagaaaaccatctccaaaaccaagggcagccccga gaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggagga gatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctggtca aaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggag agcaatgggcagccggagacaactacaagaccacacc tcccatgctggactccgacggctcctctctctctaca gcaagctcaccgaggacaagagcagglggcagcagggg aacgtcttctcactgctccgtgatgcatgaggctctgca caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgg gt</p>
<p>Ab1 версия 2 - Белок тяжелой цепи (N73D/C- терминальный лизин удален)</p>	<p>50</p>	<p>QVQLVQSCAEVKKPGASVKVSCKASCYTFSTYDINWVR QATGQGLEWMGMNPNSGNTDYAQKFGGRVTMTRETSI STAYIELSSLRSEDTAVYYCARDMVAANTDYYFYGMG VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSNFGITQYTCNVDEHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPTEKTI KTKGQPREPQVYTLPPSRDEETKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSEFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTKQSLSLSPG</p>
<p>Ab2 версия 2 - Белок тяжелой цепи (N73D/C- терминальный лизин удален)</p>	<p>51</p>	<p>QVQLVQSCAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYDINWVR QATGQGLEWMGMNPNSGYTGVAQKFGGRVTMTRETSI STAYMEMSSLRSEDTAVYYCARDIVAANTDYYFYGMG VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSNFGITQYTCNVDEHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPTEKTI</p>

		KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
Ab3 версия 2 - Белок тяжелой цепи (C- терминальный лизин удален)	52	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASCYFTFSYGISWVR QAPGQGLEWMGWLSTYSGNINYAQKLGGRVTMTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARGNFYYGMDVWGQGT VTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKIVEKCCVECPFC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKCKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
Ab1 версия 2 - Вариабельный участок тяжелой цепи (N73D/C- терминальный лизин удален)	53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSYDINWVR QATGQGLEWMGWMNPNSGNTDYAQKFGGRVTMTRETSI STAYIELSSLRSEDTAVYYCARDMVAANTDYFFYYGMD VWGQGTITVTVSS
Ab2 версия 2 - Вариабельный участок тяжелой цепи (N73D/C- терминальный лизин удален)	54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSYEINWVR QATGQGLEWMGWMNPNSGYTGYAQKFGGRVTMTRETSI STAYMEMSSLRSEDTAVYYCARDIVAANTDYFFYYGMD VWGQGTITVTVSS

Эксперименты ELISA проводили в разных форматах (ELISA с захватом в случае формата с меньшей avidностью; сэндвич-ELISA в случае формата с жидкой фазой и прямой ELISA в случае твердофазного формата с avidностью), используя антитела, содержащие вариабельные области Ab1 или Ab2 (или N73D-варианта Ab1 или Ab2) с разными Fc-областями.

Ab1 и Ab2 содержат домены C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} IgG2 человеческого происхождения. Употребляемые в данном документе термины "Ab1" и "Ab1 IgG2 WT" относятся к одному антителу. Аналогично, термины "Ab21" и "Ab2 IgG2 WT" относятся к одному антителу.

Антитела, определяемые как "IgG4P agly/IgG1" содержат вариабельные области Ab1 или Ab2 (или N73D-варианта Ab1 или Ab2), слитые с доменом C_{H1} человеческого IgG4, шарнирным доменом человеческого IgG4 с мутацией, включающей замену Ser на Pro (в позиции 228), для снижения перетасовки, домен C_{H2} человеческого IgG4 с мутацией, включающей замену Asn на Gln (в позиции 297), для удаления участка N-связанного гликозилирования и домен C_{H3} человеческого IgG1. Каркасная область "IgG4P agly/IgG1" описана в заявке на патент США № US 2012/0100140.

Результаты ELISA свидетельствуют о том, что удаление участков гликозилирования посредством замены N73D не влияет на связывание модифицированных антител с OSMR, см. табл. 10.

Таблица 10

Антитело	Захват (EC50)	Сэндвич (EC50)	Прямой (EC50)
	nM	nM	nM
Ab1 IgG2 WT	10,2	0,581	0,184
Ab1 N73D IgG2	4,85	0,359	0,0728
Ab1 N73D IgG4P agly/IgG1	2,86	0,05	0,0626
Ab2 IgG2 WT	3,63	0,366	0,182
Ab2 N73D IgG2	5,49	0,343	0,179
Ab2 N73D IgG4P agly/IgG1	1,61	0,064	0,0558

Исследование связывания проводили, используя метод BIAcore. Антитела, содержащие вариабельные области Ab1 или Ab2 (или N73D-варианта Ab1 или Ab2) с разными Fc-областями, иммобилизовали на чипе CM4 (GE lifesciences) в соответствии с протоколом производителя. Растворимый OSMR исполь-

зовали в качестве аналита. Удаление участка гликозилирования на Ab1 и Ab2 посредством замены N73D улучшало аффинность связывания. В случае Ab1 замена улучшала скорость K_{acc} , в то время, как в случае Ab2 она улучшала скорость $K_{дисс}$, см. табл. 11.

Таблица 11

Антитело	K_{acc} (M ⁻¹ c ⁻¹)	$K_{дисс}$ (1/с)	КД (М)
Ab1 IgG2 WT	1,64E+05	1,50E-04	0,913E-9
Ab1 N73D IgG2	2,49E+05	1,68E-04	0,675E-9
Ab2 IgG2 WT	1,88E+05	1,89E-04	1,01E-09
Ab2 N73D IgG2	1,73E+05	4,99E-05	0,289E-9

Стабильность фрагментов Fab определяли, оценивая термическое разворачивание антител. Высокая температура плавления фрагментов Fab напрямую связана с повышенной стабильностью. Удаление участков гликозилирования на Ab2 посредством замены N73D не влияло на термическую стабильность фрагментов Fab и оказывало ничтожное влияние на Ab1 согласно оценке, полученной в экспериментах по дифференциальной сканирующей флуориметрии, см. табл. 12.

Таблица 12

Антитело	Fab T _m (градусы Цельсия)	Средняя квадратическая ошибка (градусы Цельсия)
Ab1 IgG2 WT	73,24	0,0097
Ab1 N73D IgG2	71,21	0,005
Ab1 N73D IgG4P agly/IgG1	74,23	0,014
Ab2 IgG2 WT	76,71	0,0096
Ab2 N73D IgG2	76,54	0,14
Ab2 N73D IgG4P agly/IgG1	76,69	0,018

Оценивали способность модифицированных анти-OSMR антител блокировать сигналинг через человеческий OSMR. Модифицированные антитела оценивали в отношении их способности ингибировать пролиферацию клеточной линии BaF hu-IL31R/OSMR/gp130 в присутствии IL31, OSM или IL31 и OSM. Результаты представлены в табл. 13 и 14 с приведенными для каждого антитела значениями IC₅₀. Результаты подтверждают, что модифицированные версии Ab1 и Ab2 являются эффективными ингибиторами OSM- и IL-31-опосредуемого сигналинга.

Таблица 13

Антитело	IL31 (IC ₅₀)	OSM (IC ₅₀)	IL31/OSM (IC ₅₀)
Ab2	0,3828	0,3528	~1,9
Ab1 IgG2 WT	0,6691	0,5298	4,004
Ab1 N73D IgG2	0,7565	0,5226	3,702
Ab1 N73D IgG4P agly/IgG1	0,4672	0,5657	3,080

Таблица 14

Антитело	IL31 (IC ₅₀)	OSM (IC ₅₀)	IL31/OSM (IC ₅₀)
Ab2	0,4426	0,4019	1,8
Ab2 IgG2 WT	0,3671	0,4758	2,049
Ab2 N73D IgG2	0,2191	0,1859	1,474
Ab2 N73D IgG4P agly/IgG1	0,2838	0,2401	1,276

Изобретение было описано в терминах конкретных вариантов реализации, которые включают или предположительно включают определенные схемы практической реализации изобретения. Для специалистов в данной области техники очевидно существование разных модификаций и вариаций описанного изобретения, которые можно осуществить, не выходя за рамки объема и сущности изобретения. Хотя изобретение было описано в связи с конкретными вариантами реализации, следует понимать, что заявляемое изобретение не должно ограничиваться этими конкретными вариантами реализации. В действи-

тельности, различные модификации описанных схем осуществления изобретения, очевидные для специалистов в данной области техники, включены в объем нижеприведенной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к рецептору онкостатина М (OSMR), содержащее
вариабельный домен легкой цепи, содержащий определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), приведенную в SEQ ID NO: 31; определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (LCDR2), приведенную в SEQ ID NO: 34; и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (LCDR3), приведенную в SEQ ID NO: 37; и
вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), приведенную в SEQ ID NO: 13; определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (HCDR2), приведенную в SEQ ID NO: 16; и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (HCDR3), приведенную в SEQ ID NO: 19.
2. Антитело к OSMR по п.1, где вариабельный домен легкой цепи имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28.
3. Антитело к OSMR по п.1, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54.
4. Антитело к OSMR по п.1, где вариабельный домен легкой цепи имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, и вариабельный домен тяжелой цепи имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54.
5. Антитело к OSMR по п.1, где легкая цепь указанного антитела содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25.
6. Антитело к OSMR по п.1, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.
7. Антитело к OSMR по п.1, где указанное антитело представляет собой человеческое антитело.
8. Антитело к OSMR по п.1, где указанное антитело ингибирует связывание человеческого онкостатина М (OSM) или человеческого IL-31 с человеческим OSMR.
9. Антитело к OSMR по п.1, где указанное антитело снижает опосредуемый человеческим OSM или опосредуемый человеческим IL-31 сигналинг OSMR в человеческих клетках, экспрессирующих OSMR.
10. Антитело к OSMR по п.4, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.
11. Антитело к OSMR по п.10, где указанное антитело представляет собой человеческое антитело.
12. Антитело к OSMR по п.4, где легкая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25.
13. Антитело к OSMR по п.4, где указанное антитело ингибирует связывание человеческого OSM или человеческого IL-31 с человеческим OSMR.
14. Антитело к OSMR по п.4, где указанное антитело снижает опосредуемый человеческим OSM или опосредуемый человеческим IL-31 сигналинг OSMR в человеческих клетках, экспрессирующих OSMR.
15. Фармацевтическая композиция для снижения опосредуемого OSMR сигналинга, содержащая терапевтически эффективное количество антитела к OSMR по любому из предшествующих пунктов и носитель.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где указанный носитель является водным.
17. Фармацевтическая композиция по п.15, где указанный носитель является неводным.
18. Фармацевтическая композиция по п.15, где указанная фармацевтическая композиция представляет собой раствор.
19. Фармацевтическая композиция по п.15, где указанная фармацевтическая композиция является лиофилизированной.
20. Применение антитела к OSMR по любому из пп.1-14 в лечении зуда у нуждающегося в этом пациента.
21. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.15-19 в лечении зуда у нуждающегося в этом пациента.

