

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291541 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.09

(22) Дата подачи заявки
2020.12.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ GDF15

(31) PCT/JP2019/047956

(32) 2019.12.06

(33) JP

(86) PCT/JP2020/045062

(87) WO 2021/112185 2021.06.10

(71) Заявитель:
ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО.,
ЛТД. (JP)

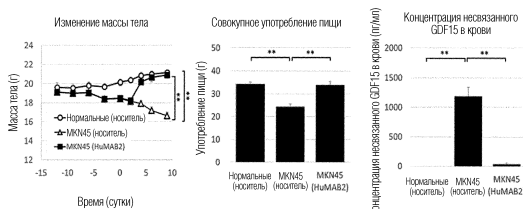
(72) Изобретатель:

Нисихара Сигеки, Исикава Юити,
Накаиси Юитиро, Кавато Тацую (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к антителу против hGDF15, которое связывается с эпитопом hGDF15, содержащим аминокислотную последовательность DHCPGPRCCRLH (SEQ ID NO: 3), и к его применениям.



N=8, среднее значение $\pm$ SEM **P<0.01

A1

202291541

202291541

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 574632EA/019

АНТИТЕЛО ПРОТИВ GDF15

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001]

Настоящей заявке испрашивается приоритет по международной заявке № РСТ/JP2019/047956, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Настоящее изобретение относится к антителам против GDF15 и к их применениям.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002]

Кахексия представляет собой комплексное метаболическое заболевание, характеризующееся снижением массы тела и мышечной слабостью, которые ассоциированы с хроническими заболеваниями. Среди них, кахексия встречается у многих пациентов с развернутой злокачественной опухолью и требует агрессивного лечения, поскольку она ухудшает прогноз и качество жизни (QOL) пациентов. Однако поскольку патофизиология кахексии является непростой и существует множество неясных моментов, касающихся механизма ее возникновения, в настоящее время отсутствует доступное эффективное терапевтическое средство.

[0003]

GDF15 (фактор роста/дифференцировки 15) представляет собой секреторный белок суперсемейства TGF- β , и было описано, что он вовлечен в различные заболевания, такие как злокачественная опухоль и диабет. Существует множество отчетов клинических исследований концентрации GDF15 в крови. Например, описаны высокие уровни GDF15 в крови и злокачественных тканях у пациентов со злокачественной опухолью и корреляция между уровнями GDF15 в крови и прогнозом у пациентов со злокачественной опухолью. Также известно, что GDF15 действует на пищевой центр головной мозга, индуцируя анорексию, и вовлечен в развитие кахексии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Проблема, подлежащая решению

[0004]

Задачей настоящего изобретения является предоставление антитела против GDF15, пригодного для лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15.

Способы решения проблемы

[0005]

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, где антитело связывается с эпитопом hGDF15, содержащим аминокислотную последовательность DHCPLGPGRCCRLH (SEQ ID NO: 3).

[0006]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0008]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков.

[0009]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием

модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0010]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 141 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0011]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0012]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 148 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0013]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против hGDF15, которое конкурирует за связывание hGDF15 с антителом согласно любому из предшествующих абзацев.

[0014]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему антителу согласно любому из предшествующих абзацев, экспрессирующему вектору, содержащему такой полинуклеотид, или трансформированной клетке, содержащей такой полинуклеотид.

[0015]

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антителу согласно любому из предшествующих абзацев.

Эффект изобретения

[0016]

Антитело против hGDF15 по настоящему изобретению распознает эпитоп, отличающийся от эпитопов существующих антител против hGDF15, и оно является пригодным для лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15.

Краткое описание чертежей

[0017]

На фиг.1 представлены результаты сравнительных тестов с использованием четырех моноклональных антител против hGDF15 (HuMAB2, MAB17, Hu01G06-127, MAB957).

На фиг.2A представлены результаты анализа трехмерной структуры сокристалла Fab HuMAB2 и hGDF15.

На фиг.2B представлены результаты анализа эпитопов и паратопов посредством анализа трехмерной структуры сокристалла Fab HuMAB2 и hGDF15.

На фиг.3 представлены результаты анализа трехмерной структуры для связывания между Fab HuMAB2 и hGDF15. hGDF15 образует гомодимер, и среди аминокислот, с которыми связывается HuMAB2, аминокислоты, присутствующие в одном из мономеров hGDF15 (мономер 1) подчеркнуты, и аминокислоты, присутствующие в другом мономере (мономер 2) (71D72T), подчеркнуты двойной линией. Аминокислоты, которые являются важными для связывания, представлены полужирным шрифтом, и аминокислоты, с которыми HuMAB2 связывается особенно сильно, указаны стрелками.

На фиг.4 представлены результаты анализа связывания между HuMAB2 и hGDF15 или синтетическим пептидом DHCPLGPGRCRLH (SEQ ID NO: 3).

На фиг.5A представлено связывание вариантов HuMAB2 с hGDF15 (антитела с модифицированной Н-цепью 1/2).

На фиг.5B представлено связывание вариантов HuMAB2 с hGDF15 (антитела с модифицированной Н-цепью 2/2).

На фиг.5C представлено связывание вариантов HuMAB2 с hGDF15 (антитела с модифицированной L-цепью 1/2).

На фиг.5D представлено связывание вариантов HuMAB2 с hGDF15 (антитела с модифицированной L-цепью 2/2).

На фиг.6 представлено улавливание hGDF15 в крови посредством HuMAB2 и MAB17.

На фиг.7 представлен эффект антитела против hGDF15 на концентрацию несвязанного hGDF15 в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль.

На фиг.8 представлен эффект HuMAB2 на снижение массы тела, совокупное употребление пищи и концентрацию несвязанного hGDF15 в крови в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль.

На фиг.9 представлен эффект HuMAB2 на активность (суточный ритм) в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль.

На фиг.10 представлено связывание вариантов HuMAB2 с hGDF15.

На фиг.11 представлено связывание вариантов HuMAB2 с hGDF15, где варианты

HuMAB2 состоят из варианта Н-цепи (H49R, H49D, H48S, H71Y, H83R или H120F) и варианта L-цепи (L48K, L112D, L72F или L74H).

На фиг.12 представлена схема оценки ингибиторной активности антитела против hGDF15 в отношении образования комплекса GDF15 и GFRAL.

На фиг.13 представлена схема оценки ингибиторной активности HuMAB2 в отношении образования комплекса GDF15, GFRAL и RET, и результаты оценки.

На фиг.14 представлен эффект MAB1 на снижение массы тела, совокупное употребление пищи и концентрацию несвязанного hGDF15 в крови в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль.

Подробное описание вариантов осуществления

[0018]

Если нет иных указаний, термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, в основном понятные специалистам в таких областях, как органическая химия, медицинская наука, фармацевтическая наука, молекулярная биология и микробиология. Определения некоторых терминов, используемых в настоящем описании, приведены ниже, и эти определения в настоящем описании имеют преимущество над общим пониманием.

[0019]

В настоящем описании, когда число сопровождается термином "приблизительно", подразумевается, что оно включает диапазон $\pm 10\%$ от этой величины. Например, "приблизительно 20" включает "от 18 до 22". Диапазон чисел включает все числа между конечными точками и числа конечных точек. "Приблизительно" для диапазона применимо к обоим концам этого диапазона. Таким образом, например, "приблизительно от 20 до 30" включает "от 18 до 33".

[0020]

В настоящем описании аминокислотные остатки приводятся с использованием следующих сокращенных обозначений.

Ala или A: аланин

Arg или R: аргинин

Asn или N: аспарагин

Asp или D: аспарагиновая кислота

Cys или C: цистеин

Gln или Q: глутамин

Glu или E: глутаминовая кислота

Gly или G: глицин

His или H: гистидин

Ile или I: изолейцин

Leu или L: лейцин

Lys или K: лизин

Met или M: метионин

Phe или F: фенилаланин

Pro или P: пролин

Ser или S: серин

Thr или T: треонин

Trp или W: триптофан

Tyr или Y: тирозин

Val или V: валин

В настоящем описании аминокислотный остаток в аминокислотной последовательности может быть указан числом, соответствующим его положению, и сокращенным обозначением, соответствующим аминокислотному остатку (например, остаток аргинина в положении 13 обозначается как "13R").

[0021]

GDF15 (фактор роста/дифференцировки 15) представляет собой секретируемый белок суперсемейства TGF- β , также известный как MIC-1, PLAB, PDF и NAG-1. Ген GDF15 экспрессирует предшественник, про-GDF15, и этот про-GDF15 расщепляется металлоэндопротеазой мембранного типа с образованием зрелого GDF15. GDF15 является растворимым, и полагают, что он образует димер, распознаваемый его рецептором GFRAL. Если нет иных указаний, термин GDF15, как используют в рамках изобретения, означает зрелый GDF15.

[0022]

Как используют в рамках изобретения, подразумевается, что термин GDF15 включает GDF15 любого вида. В одном из вариантов осуществления GDF15 представляет собой GDF15 человека (hGDF15). Репрезентативная аминокислотная последовательность про-hGDF15 представлена в SEQ ID NO: 1. Про-hGDF15 представляет собой полипептид из 308 аминокислот, состоящий из сигнального пептида из 29 аминокислот (подчеркнут), пропептида из 167 аминокислот и зрелого пептида из 112 аминокислот (подчеркнут двойной линией, hGDF15). Репрезентативная аминокислотная последовательность hGDF15 представлена в SEQ ID NO: 2, однако hGDF15 в рамках настоящего изобретения не ограничивается полипептидами, содержащими аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Про-hGDF15 (SEQ ID NO: 1)

Pro hGDF15 (SEQ ID NO: 1)

MPGQELRTVN GSQMLLVLLV LSWLPHGGAL SLAEASRAS FPGSELHSED
SRFRELKRKY EDLLTRLRAN QSWEDSNTDL VPAPAVRILT PEVRLGSGGH
LHLRISR AAL PEGLP EASRL HRALFRLSPT ASRSWDVTRP LRRQLSLARP
QAPALHLRLS PPSQSDQLL AESSSARPQL ELHLRPQAAR GRRRARARNG
DHCPLGPGR CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA
ANMHAQIKTS LHRLKPDTPV APCCVPASYN PMVLIQKTD TGVSLQTYDDL
LAKDCHCI

hGDF15 (SEQ ID NO: 2)

ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS
 QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTD TGVS LQT
 YDDL LAKDCH CI

[0023]

Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, означает молекулу, содержащую иммуноглобулин или его часть и способную связываться с антигеном, и подразумевается, что он включает не только молекулы в форме природных иммуноглобулинов, но также и различные молекулы, имеющие отличающиеся структуры, такие как химерные антитела, гуманизированные антитела, мультиспецифические антитела и фрагменты антител. Термин "моноклональный", как используют в рамках изобретения, используется для того, чтобы отличить антитело от "поликлонального антитела", которое представляет собой смесь множества антител против различных эпитопов, и он означает, что антитело может быть получено из совокупности одинаковых антител. Таким образом, термин "моноклональное антитело" может означать, например, химерное антитело, гуманизированное антитело, антитело человека, мультиспецифическое антитело и фрагмент антитела. Фрагмент антитела означает молекулу, содержащую часть иммуноглобулина в качестве ее компонента. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, переменные области тяжелой и легкой цепей антитела (V_H и V_L), $F(ab')_2$, Fab' , Fab , Fv , связанный дисульфидной связью FV ($sdFv$), одноцепочечный FV ($scFv$) и их конъюгаты. Антитело не ограничивается антителом конкретного вида, и оно может представлять собой антитело мыши, крысы, кролика, козы или человека.

[0024]

Как используют в рамках изобретения, термин "выделенный" означает, что биологическая молекула (например, антитело или полинуклеотид) по существу отделена от других компонентов ее естественного окружения.

[0025]

Класс иммуноглобулинов в антителах определяется, исходя из их константной области тяжелой цепи. Классы иммуноглобулинов включают IgA , IgD , IgE , IgG и IgM , и соответствующие тяжелые цепи называют α -цепью, δ -цепью, ϵ -цепью, γ -цепью и μ -цепью,

соответственно. Класс иммуноглобулина может быть далее подразделен на подклассы (изотипы), такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Класс и подкласс иммуноглобулина в антителе по настоящему изобретению не ограничивается каким-либо конкретным классом и подклассом. В одном из вариантов осуществления класс иммуноглобулина представляет собой IgG. Легкая цепь антитела может быть подразделена на цепь κ и цепь λ на основе его константной области, и антитело по настоящему изобретению может иметь либо цепь κ , либо цепь λ .

[0026]

Вариабельная область антитела обычно содержит три определяющих комплементарность области (также обозначаемых как CDR), находящихся между четырьмя каркасными областями (также обозначаемыми как FR). FR и CDR, главным образом, имеют порядок FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 как для легкой, так и для тяжелой цепей. Описано несколько способов определения вариабельных областей и CDR антител, и примеры таких способов включают определения согласно Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991), Chothia (Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987; 196: 901-917), AbM (Martin et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1989; 86: 9268-9272), Contact (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 1996; 262: 732-745) и IMGT (Lefranc et al., Dev Comp Immunol. 2003; 27(1): 55-77). В настоящем описании используется определение согласно Kabat, если нет иных указаний.

[0027]

Как используют в рамках изобретения, "антитело против hGDF15" означает антитело, которое связывает hGDF15 с достаточной аффинностью, чтобы продемонстрировать желаемый эффект. Антитело против hGDF15 по настоящему изобретению может быть получено посредством общепринятого способа с использованием hGDF15 или его части в качестве иммуногена. Иммуноген может быть получен общепринятыми способами пептидного синтеза, например, способами генной инженерии или химическим синтезом. Альтернативно антитело по настоящему изобретению может быть получено путем получения экспрессирующего вектора, содержащего ген антитела, с использованием способов генной инженерии и экспрессии антитела в клетках.

[0028]

Поликлональное антитело может быть получено посредством общих способов, таких как способы, описанные в "Antibodies: A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989". В частности, поликлональное антитело может быть получено путем иммунизации млекопитающего, такого как крыса, мышь, кролик, коза или лошадь, вышеупомянутым иммуногеном.

[0029]

Моноклональное антитело может быть получено способами, известными в данной области, например, путем получения гибридомы, которая продуцирует антитело, или путем получения экспрессирующего вектора, содержащего ген антитела, с

использованием способов генной инженерии и экспрессии антитела в клетках.

[0030]

Гибридома, которая секретирует моноклональное антитело, может быть получена способом, описанным в Kohler et al., Nature 256: 495, 1975. Сначала иммуноген смешивают с подходящим веществом для повышения антигенности иммуногена (например, гемоцианин лимфы улитки или бычий сывороточный альбумин) и при необходимости с иммуностимулятором (например, полный или неполный адъювант Фрейнда), и используют для иммунизации не являющегося человеком млекопитающего, такого как крыса, мышь, кролик, коза или лошадь. Обычно животное иммунизируют несколько раз с интервалами от 3 до 10 суток, и вводят от 1 до 100 мкг иммуногенного пептида. Затем иммунные клетки (клетки, способные продуцировать антитела в иммунизированном животном) извлекают из иммунизированного животного после многократных иммунизаций и подвергают слиянию с миеломными клетками, которые неспособны продуцировать их собственные антитела (например, клетки, происходящие из млекопитающего, такого как мышь, крыса, морская свинка, хомячок, кролик или человек). Слияние клеток можно проводить с использованием, например, полиэтиленгликоля или посредством электрического слияния. Затем проводят селекцию клеток, которые были успешно получены посредством слияния клеток, на основе селективного маркера, которым обладают слитые клетки, и подтверждают реактивность антитела, продуцируемого отобранными клетками, к иммуногену, например, посредством иммуноанализа, как описано ниже, и, наконец, получают гибридому, которая продуцирует представляющее интерес антитело. Моноклональное антитело может быть выделено из культурального супернатанта, полученного посредством культивирования полученной таким образом гибридомы *in vitro*. Альтернативно гибридому можно культивировать *in vivo* в асцитной жидкости животного, такого как мышь, крыса, морская свинка, хомячок или кролик, и из асцитной жидкости может быть выделено моноклональное антитело.

[0031]

Моноклональное антитело также может быть получено путем получения экспрессирующего вектора, содержащего ген антитела, и экспрессии антитела в клетках-хозяевах (P.J.Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY; P.Shepherd and C.Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J.W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS). Альтернативно моноклональное антитело может быть получено с использованием способов получения трансгенных животных для получения трансгенного животного (например, коровы, козы, овцы или свиньи), у которого ген представляющего интерес антитела встроен в эндогенные гены. Моноклональное антитело, происходящее из гена антитела, может быть получено из молока трансгенного животного.

[0032]

Моноклональное антитело, полученное таким образом, может быть очищено посредством надлежащего комбинирования способов, известных в данной области, таких

как хроматография с использованием колонок с белком А, ионообменная хроматография, гидрофобная хроматография, способ высаливания, гель-фильтрация и аффинная хроматография.

[0033]

Химерное антитело представляет собой антитело, которое содержит последовательности, происходящие из различных источников, и оно может представлять собой антитело, в котором переменная область, происходящая из одного источника, связана с константной областью, происходящей из другого источника. В одном из вариантов осуществления химерное антитело состоит из переменной области антитела, происходящего из не являющегося человеком млекопитающего, и константной области, происходящей из антитела человека. Химерное антитело может быть получено, например, путем соединения полинуклеотида, кодирующего переменную область антитела не являющегося человеком млекопитающего, и полинуклеотида, кодирующего константную область антитела человека, встраиванием полученного таким образом полинуклеотида в экспрессирующий вектор, введением экспрессирующего вектора в хозяина и экспрессией антитела в хозяине.

[0034]

CDR представляет собой область, которая по существу определяет специфичность связывания антитела, и аминокислотные последовательности CDR демонстрируют значительное разнообразие. Напротив, аминокислотные последовательности, составляющие FR, демонстрируют высокую гомологию даже среди антител, обладающих различной специфичностью связывания. Таким образом, специфичность связывания одного антитела может быть перенесена на другое антитело путем трансплантации CDR.

[0035]

Различные способы трансплантации CDR известны и описаны, например, в следующих документах: патент США № 7022500, патент США № 6982321, патент США № 6180370, патент США № 6054297, описание патента США № 5693762, патент США № 5859205, патент США № 5693761, патент США № 5565332; патент США № 5585089, патент США № 5530101, патент США № 5225539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-327; Queen, et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 86:10029-10033; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536; Winter (1998) *FEBS lett* 430:92-94.

[0036]

Гуманизированное антитело обычно состоит из CDR антитела, происходящего из не являющегося человеком животного, FR, происходящих из антитела человека, и константных областей, происходящих из антитела человека. Гуманизированное антитело может быть получено посредством трансплантации CDR антитела, происходящего из не являющегося человеком животного, в антитело человека. Гуманизированное антитело может быть получено различными способами, одним из примеров которых является ПЦР с перекрывающимися праймерами (Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-

1633(2008)). В этом способе олигонуклеотид, имеющий часть, которая перекрывает концы CDR антитела не являющегося человеком животного (например, антитело мыши) и FR из антитела человека, используют в качестве праймера для ПЦР для синтеза полинуклеотида, в котором CDR антитела не являющегося человеком животного и FR антитела человека связаны. Далее, полученный таким образом полинуклеотид лигируют с полинуклеотидом, кодирующим константную область антитела человека, и включают в экспрессирующий вектор, и экспрессирующий вектор вводят в хозяина для экспрессии с получением гуманизированного антитела.

[0037]

Последовательности FR можно определять на основе базы данных (например, VBase, <https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>), в которой описаны последовательности генов антител зародышевого типа, или источников литературы (например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991); Tomlinson, I. M. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cox, J. P. L. et al. (1994) *Eur. J Immunol.* 24:827-836). FR могут содержать одну или несколько мутаций аминокислот по сравнению с последовательностями зародышевого типа. То, как выбирать подходящие FR, известно, и FR могут представлять собой FR, выбранные способом наилучшего соответствия (Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)), или FR, происходящие из консенсусных последовательностей конкретной подгруппы вариабельных областей легкой или тяжелой цепей антител человека (Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta et al. *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

[0038]

Антитело человека может быть получено, например, посредством сенсibilизации лимфоцитов человека *in vitro* желаемым антигеном, а затем слияния сенсibilизированных лимфоцитов с клетками миеломы человека (публикация патента Японии № Hei1-59878). Для клеток миеломы человека, которые являются партнерами по слиянию, можно использовать, например, U266. Антитело человека также может быть получено посредством иммунизации трансгенного животного. Имеющего полный репертуар генов антител человека, желаемым антигеном (Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125, 2005). Также известно, что антитело человека может быть получено посредством пэннинга с использованием библиотеки антител человека (*Antibody Phage Display: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 178, 2001). Например, вариабельные области антител человека экспрессируют в качестве одноцепочечного антитела (scFv) на поверхности фагов способом фагового дисплея для селекции фага, который связывается с антигеном, и ген отобранного фага анализируют для определения последовательности ДНК, кодирующей вариабельную область антитела человека, которое связывается с антигеном. Затем антитело человека может быть получено посредством лигирования этой последовательности вариабельной области с последовательностью константной области антитела человека в рамке считывания, встраивания последовательности в соответствующий экспрессирующий вектор, введения этого экспрессирующего вектора в

хозяина и экспрессии антитела.

[0039]

Мультиспецифическое антитело представляет собой антитело, которое связывается по меньшей мере с двумя различными участками. Примеры мультиспецифических антител включают биспецифические антитела и триспецифические антитела. В одном из вариантов осуществления мультиспецифическое антитело связывает hGDF15 и один или несколько различных антигенов. Мультиспецифическое антитело может быть получено, например, способами генной инженерии или посредством связывания двух или более антител, которые распознают различные антигены.

[0040]

Фрагмент антитела может быть получен, например, посредством расщепления антитела протеазой, такой как папаин или пепсин. Альтернативно, фрагмент антитела может быть получен путем введения экспрессирующего вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела, в клетки-хозяева и экспрессии фрагмента (например, Co, M. S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. и Skerra, A., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137; Hudson et al., *Nat. Med.*, (2003) 9, 129-134).

[0041]

Как описано выше, антитело может быть получено путем введения экспрессирующего вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело, в клетки и экспрессии антитела. В частности, экспрессирующий вектор конструируют так, чтобы последовательность, кодирующая антитело, экспрессировалась под контролем контролирующей экспрессию области, такой как энхансер или промотор, и этот экспрессирующий вектор используют для трансформации клеток-хозяев для экспрессии антитела.

[0042]

Таким образом, настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему антитело против hGDF15, экспрессирующему вектору, содержащему такой полинуклеотид, и к трансформированной клетке, содержащей полинуклеотид, способный экспрессировать антитело, как описано в настоящем описании.

[0043]

В качестве клеток-хозяев можно использовать, эукариотические клетки, например, такие как клетки животных, клетки растений и клетки грибов. Примеры клеток животных включают клетки млекопитающих (например, CHO, COS, NIH3T3, клетки миеломы, клетки почки детенышей хомячка (BHK), HeLa, Vero), клетки земноводных (например, ооциты *Xenopus*) и клетки насекомых (например, Sf9, Sf21, Tn5). Клетки грибов включают дрожжи (например, род *Saccharomyces*, как например, *Saccharomyces cerevisiae*) и нитчатые грибы (например, род *Aspergillus*, как например, *Aspergillus niger*). Также в

качестве клеток-хозяев можно использовать прокариотические клетки, такие как *E. coli* (например, JM109, DH5 α , HB101), и в качестве клеток-хозяев также можно использовать *Bacillus subtilis*. Вектор может быть введен в клетки-хозяева способом с использованием, например, фосфата кальция или DEAE-декстрана, электропорации или липофекции.

[0044]

Связывание полученного антитела с антигеном может быть подтверждено способами иммуноанализа, такими как ферментный иммуноанализ (EIA) (включая ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), хемолуминесцентный иммуноанализ (CIA) и флуоресцентный иммуноанализ (FIA), или анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®. Связывание антитела с антигеном также может быть подтверждено посредством конкурентного анализа. Например, оно может быть подтверждено путем изучения того, конкурирует ли полученное антитело с антителом против hGDF15, для которого подтверждено, что оно связывается с hGDF15.

[0045]

Как используют в рамках изобретения, антитело, которое конкурирует с данным антителом против hGDF15 (т.е. эталонным антителом), означает антитело, которое значительно снижает связывание эталонного антитела с hGDF15 при определении в условиях, описанных в примерах. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению снижает связывание эталонного антитела с hGDF15 на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% или более.

[0046]

В одном из вариантов осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению связывается с эпитопом hGDF15, содержащим аминокислотную последовательность DHCPLGPGRCCRLH (SEQ ID NO: 3). Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 3 соответствует аминокислотным остаткам в положениях 5-18 SEQ ID NO: 2. То, связывается ли антитело с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность DHCPLGPGRCCRLH (SEQ ID NO: 3), можно подтверждать посредством изучения того, конкурирует ли антитело за связывание hGDF15 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[0047]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению конкурирует с данным антителом против hGDF15 за связывание с hGDF15. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению конкурирует за связывание hGDF15 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[0048]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

В этом варианте осуществления CDR могут быть идентифицированы любым способом. CDR, содержащаяся в данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, означает CDR, состоящую из аминокислотной последовательности, идентифицированной определенным способом из данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, и вариабельная область тяжелой или легкой цепи, которая содержит такие CDR, может

отличаться от данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи в последовательности, отличной от CDR. Специалист в данной области может идентифицировать CDR подходящим способом, учитывая различные условия. В одном из вариантов осуществления CDR идентифицированы посредством любого из способов определения, выбранных из Kabat, Chothia, AbM, Contact и IMGT.

[0049]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0050]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-44 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 45-48, 52-66 и 151-153, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 49, 50 и 67-80; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106-115 и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 91-99 и 118-132.

[0051]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-42 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 46-48, 52-66 и 151-152, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 71, 73, 77 и 79; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-83, 85-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106, 108-111, 113-115 и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[0052]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из (1)-(3), и вариабельную область легкой цепи, выбранную из (4)-(6):

(1) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-44 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(2) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID

NO: 19, 45-48, 52-66, и 151-153, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(3) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 49, 50 и 67-80;

(4) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(5) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106-115 и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

(6) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 91-99 и 118-132.

[0053]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из (1)-(3), и вариабельную область легкой цепи, выбранную из (4)-(6):

(1) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-42 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(2) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 46-48, 52-66 и 151-152, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(3) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID

NO: 20, 71, 73, 77 и 79;

(4) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-83, 85-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(5) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106, 108-111, 113-115 и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

(6) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[0054]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из (1)-(3), и вариабельную область легкой цепи, выбранную из (4)-(6):

(1) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38 и 39

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(2) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 52 и 66, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(3) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 и 77;

(4) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21 и 85,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(5) вариабельная область легкой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 155 и 157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

(6) вариабельная область легкой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23 и 95.

[0055]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-44 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 45-48, 52-66 и 151-153, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 49, 50 и 67-80, и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 21, 81-89, 100-104 и 154,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (v) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 22, 90, 106-115 и 155-157, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или
 (vi) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 23, 91-99 и 118-132.

[0056]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 18, 38-42 и 149-150,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 45-48, 52-66 и 151-152, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (iii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 71, 73, 77 и 79, и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (iv) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-83, 85-89, 100-104 и 154,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (v) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106, 108-111, 113-115 и 155-157, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или
 (vi) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[0057]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 141 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0058]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143 наличием модификации от одного до трех

аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 148 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[0059]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков.

[0060]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием аминокислотной замены, выбранной из H48R, H49R, H49D, H50R, H50S, H50F, H52R, H52Q, H72R, H73D, H73R, H73Y, H119R, H119F, H48S, H71Y, H72A, H72L, H72N, H72T, H72W, H75H, H75L, H75N, H75Q, H79H, H79K, H79Q, H79R, H83R, H117Q, H119E, H119H, H119K, H119N, H119Q, H119S, H119T, H120A, H120D, H120F, H120N, H120Q, H122F, H54T, H54N, H71R, H71H и H77I, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием аминокислотной замены, выбранной из L47R, L48E, L48R, L48S, L48K, L50D, L50R, L50F, L50Y, L73R, L111F, L111Y, L112E, L112R, L112D, L112F, L113D, L113R, L113F, L48H, L48Y, L50Q, L50W, L51Q, L69Y, L70F, L70H, L72D, L72E, L72R, L72Y, L73K, L73N, L73Y, L75Q, L87K, L87N, L111A, L111N, L111S, L112H, L112Q, L112T, L112Y, L113S, L114F, L114H, L114I, L114N, L114Y, L116H, L116Y, L51Y, L72F, L73Q и L74H.

[0061]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием аминокислотной замены, выбранной из H49R, H49D, H50R, H50S, H50F, H73D, H73R, H73Y, H48S, H71Y, H72A, H72L, H72N, H72T, H72W, H75H, H75L, H75N, H75Q, H79H, H79K, H79Q, H79R, H83R, H119N, H119S, H120F, H120Q, H54T, H54N, H71R и H71H, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием аминокислотной замены, выбранной из L47R, L48E, L48R, L48K, L50D, L50R, L50F, L50Y, L73R, L112E, L112D, L112F, L113D, L113R, L113F, L48H, L48Y, L50Q, L50W, L51Q, L70F, L72D, L72E, L72R, L72Y, L73N, L73Y, L75Q, L112H, L112Q, L112Y, L113S, L116H, L116Y, L51Y, L72F, L73Q и L74H.

[0062]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая

отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием аминокислотной замены, выбранной из H49R, H49D, H48S, H71Y, H83R и H120F, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием аминокислотной замены, выбранной из L48K, L112D, L72F и L74H.

[0063]

В приведенных выше вариантах осуществления аминокислотные замены указаны посредством сокращенного обозначения, соответствующего аминокислотному остатку до замены, причем число соответствует его положению, и сокращенное обозначение указывает на аминокислотный остаток после замены. Например, "H48R" означает замену остатка гистидина в положении 48 на остаток аргинина.

[0064]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[0065]

В следующем варианте осуществления антитело против hGDF15 по настоящему изобретению содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 6 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 134 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 135 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков.

[0066]

Как используют в рамках изобретения, модификация аминокислоты включает делецию, замену, инсерцию и вставку аминокислоты. Модификация может представлять собой любую из, или комбинацию двух или более из, делеции, замены, инсерции и вставки. Количество модификаций может составлять, но не ограничиваться ими, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3. В одном из вариантов осуществления модификация аминокислоты представляет собой аминокислотную замену. В следующем варианте осуществления модификация аминокислоты представляет собой модификацию от одного до трех аминокислотных остатков. В следующем варианте осуществления модификация аминокислоты представляет собой замену одной аминокислоты.

[0067]

Как используют в рамках изобретения, аминокислотная последовательность, которая "содержит" данную аминокислотную последовательность, включает аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность и один или несколько аминокислотных остатков, добавленных к данной аминокислотной последовательности, и аминокислотную последовательность, состоящую из данной аминокислотной последовательности.

[0068]

Как используют в рамках изобретения, переменная область тяжелой или легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью данной переменной области тяжелой или легкой цепи, и переменной области тяжелой или легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности данной переменной области тяжелой или легкой цепи наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков, включает переменную область тяжелой или легкой цепи, в которой CDR в аминокислотной последовательности данной переменной области тяжелой или легкой цепи не являются модифицированными.

[0069]

Как используют в рамках изобретения, "идентичность последовательностей" в отношении аминокислотной последовательности относится к доле аминокислотных остатков, которые совпадают между некоторой последовательностью и последовательностью для сравнения, которые оптимально выровнены (т.е. выровнены так, что эти две последовательности максимально совпадают) на протяжении всей области последовательностей. Последовательности могут иметь вставку или делецию (например, пропуск) при оптимальном выравнивании двух последовательностей. Идентичность последовательностей может быть вычислена с использованием программ, таких как FASTA, BLAST и CLUSTAL W, предоставленных в общедоступных базах данных (например, DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)). Альтернативно, идентичность

последовательностей также может быть получена с использованием коммерчески доступного программного обеспечения для анализа последовательностей (например, программного обеспечения Vector NTI®, GENETYX® ver. 12).

[0070]

Известны различные способы получения антитела, обладающего желаемым свойством, посредством модификации его аминокислотной последовательности. Например, варианты с повышенной аффинностью связывания могут быть получены способом на основе фагового дисплея. В этом способе область, в которую вносят мутацию, определяют путем идентификации аминокислотных остатков, которые влияют на взаимодействие между антителом и антигеном, способом аланин-сканирующего мутагенеза или посредством идентификации точки контакта между антителом и антигеном путем анализа кристаллической структуры комплекса антиген-антитело. Вариант, имеющий желаемое свойство, может быть получен путем получения вариантов, в которых аминокислота в участке, идентифицированном таким образом, модифицирована, например, посредством ПЦР с пониженной точностью или сайт-специфического мутагенеза, и скрининга библиотеки полученных вариантов.

[0071]

Антитело по настоящему изобретению обладает эффектом снижения концентрации GDF15 в крови. То, обладает ли антитело таким эффектом, может быть подтверждено посредством оценки того, снижает ли антитело значительно концентрацию GDF15 в крови животного, которому трансплантированы экспрессирующие GDF15 злокачественные клетки, по сравнению с контрольным антителом, как описано в примерах. Без связи с какой-либо теорией, считается, что антитело по настоящему изобретению снижает концентрацию GDF15 в крови путем подавления расщепления про-GDF15. Антитело по настоящему изобретению также может связываться со зрелым GDF15 и имеет эффект ингибирования передачи сигнала с GDF15.

[0072]

Антитело по настоящему изобретению может иметь эффект улучшения симптома, такого как снижение массы тела, потеря аппетита или нарушение суточного ритма, путем снижения концентрации GDF15 в крови (в некоторых случаях дополнительно путем ингибирования передачи сигнала GDF15).

[0073]

Для антитела может быть выбран подкласс иммуноглобулина или аминокислотная последовательность или сахарная цепь Fc-области может быть модифицирована для регуляции активности антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), активности комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или фармакокинетики. Например, IgG4 может быть выбран для снижения способности к активации комплемента. Кроме того, может быть осуществлена модификация, которая снижает или усиливает связывание с Fc-рецептором или C1q, или модификация, которая повышает аффинность связывания с FcRn, для продления времени полужизни в крови.

[0074]

Антитело также может быть связано с полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксикалкен или сополимер полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, например, для продления времени полужизни в крови или повышения стабильности антитела.

[0075]

Антитело также может быть связано с веществом, таким как химиотерапевтическое средство, токсический пептид или радиоизотоп. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбусил и ифосфамид; метаболические антагонисты, такие как азатиопурин и меркаптопурин; алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин), алкалоиды, такие как таксан (например, паклитаксел, доцетаксел), этопозид и тенипозид; ингибиторы топоизомеразы, такие как камптотецин (например, иринотекан и топотекан); и цитотоксические антибиотики, такие как актиномицин, антрациклин, доксорубин, даунорубин, валрубин, идарубин, эпирубин, блеомицин, пликамицин и митомицин.

[0076]

Антитело по настоящему изобретению может использоваться в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции. Антитело по настоящему изобретению обладает эффектом снижения концентрации GDF15 в крови (в некоторых случаях дополнительно обладает эффектом ингибирования передачи сигнала GDF15), и является пригодным для лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15. Примеры заболеваний или симптомов, ассоциированных с GDF15, включают снижение массы тела, потерю аппетита, снижение мышечной массы, снижение активности, нарушение суточного ритма, аномальную секрецию гормонов гипофиза, дисфункцию терморегуляции, кахексию, злокачественную опухоль, диабет, почечную недостаточность, сердечную недостаточность, СПИД, ХОЗЛ, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, сепсис, туберкулез, саркопению, метастазирование злокачественной опухоли в кости, индуцированную противораковым средством тошноту и рвоту, неукротимую рвоту беременных, хронические миелопролиферативные нарушения (например, миелофиброз, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия), нервную анорексию, биполярное расстройство, митохондриальное заболевание и связанную с ICU мышечную слабость.

[0077]

В одном из вариантов осуществления кахексия представляет собой кахексию, ассоциированную со злокачественной опухолью, диабетом, почечной недостаточностью, сердечной недостаточностью, СПИДом, ХОЗЛ, рассеянным склерозом, ревматоидным артритом, сепсисом или туберкулезом. В следующем варианте осуществления кахексия представляет собой кахексию при злокачественной опухоли. Лечение кахексии включает смягчение одного или нескольких симптомов, выбранных из снижения массы тела, снижения аппетита, снижения мышечной массы, снижения активности, нарушения

суточного ритма, аномальной секреции гормонов гипофиза и дисфункции терморегуляции.

[0078]

Примеры злокачественных опухолей включают, но не ограничиваются ими, рак желудка, рак пищевода, рак толстого кишечника, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак молочной железы, рак шейки матки, рак тела матки, рак яичка, рак мочевого пузыря, рак щитовидной железы, печеночно-клеточную карциному, рак внутриспеченочных желчных протоков, рак головы и шеи, лейкоз, множественную миелому, лимфому, опухоль головного мозга, глиому и меланому.

[0079]

Антитело по настоящему изобретению вводят индивидууму в количестве, способному обеспечивать желаемый эффект (например, лечение заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15) (называемом в настоящем описании эффективным количеством). Дозу антител соответствующим образом выбирают в зависимости от таких факторов, как способ их введения и возраст, масса тела и состояние здоровья индивидуума. Например, антитело можно вводить в дозе от 10 мкг/кг до 100 мг/кг, от 100 мкг/кг до 10 мг/кг или от 1 мг/кг до 10 мг/кг в сутки для взрослого каждые сутки, один раз в несколько суток, один раз в неделю, один раз в несколько недель, один раз в месяц или один раз в несколько месяцев, хотя антитело можно вводить иным образом. Способ введения антитела также выбирают соответствующим образом в зависимости от таких факторов, как возраст, масса тела и состояние здоровья индивидуума. Способ введения может представлять собой пероральное введение или парентеральное введение, и парентеральное введение является предпочтительным. Примеры парентерального введения включают подкожное введение, внутрикожное введение, внутримышечное введение и внутривенное введение, и внутривенное введение является предпочтительным.

[0080]

Как используют в рамках изобретения, "индивидуумом" является млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, мышей, крыс, кроликов, кошек, собак, овец, свиней, лошадей, коров, обезьян и людей. В одном из вариантов осуществления индивидуумом является человек.

[0081]

Фармацевтическая композиция может быть составлена общепринятыми способами. В дополнение к антителу, фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель или добавку, такие как стерильная вода, солевой раствор, стабилизатор, эксципиент, антиоксидант, буферное вещество, консервант, поверхностно-активное вещество, хелатирующий агент или связующее вещество.

[0082]

Антитело по настоящему изобретению может использоваться в комбинации с другим терапевтическим средством. В настоящем описании, когда два или более активных

ингредиентов используют в комбинации, все или часть активных ингредиентов могут содержаться в одной композиции, или все из средств могут содержаться в различных композициях по отдельности. Схема введения двух или более активных ингредиентов может быть одинаковой или может различаться.

[0083]

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению используют в комбинации с терапевтическим средством против злокачественной опухоли. Примеры терапевтических средств против злокачественной опухоли включают, но не ограничиваются ими, алкилирующие средства, такие как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбусил и ифосфамид; метаболические антагонисты, такие как азатиопурин и меркаптопурин; алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин), алкалоиды, такие как таксан (например, паклитаксел, доцетаксел), этопозид и тенипозид; ингибиторы топоизомеразы, такие как камптотецин (например, иринотекан и топотекан); и цитотоксические антибиотики, такие как актиномицин, антрациклин, доксорубицин, даунорубицин, валрубицин, идарубицин, эпирубицин, блеомицин, пликамицин и митомицин; молекулярные таргетные средства, такие как ингибиторы EGFR, ингибиторы HER2, ингибиторы ALK и ингибиторы VEGFR; ингибиторы иммунной точки контроля, такие как антитела против PD-1 антитела, антитела против PD-L1.

[0084]

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже.

[0085]

[1] Антитело против hGDF15, где антитело связывается с эпитопом hGDF15, содержащим аминокислотную последовательность DHCPLGPGRCCRLH (SEQ ID NO: 3).

[2] Антитело согласно положению 1, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR3, состоящей из

аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[3] Антитело согласно положению 1 или 2, где антитело содержит

варибельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 21 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[4] Антитело против hGDF15, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной

последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[5] Антитело против hGDF15, где антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[6] Антитело согласно любому из положений 2-5, где аминокислотная модификация от одного до трех аминокислотных остатков представляет собой модификацию одного аминокислотного остатка.

[7] Антитело согласно любому из положений 2-6, где аминокислотная

модификация представляет собой аминокислотную замену.

[8] Антитело согласно любому из положений 2-7, где аминокислотная модификация от одного до трех аминокислотных остатков представляет собой аминокислотную замену одного аминокислотного остатка.

[9] Антитело согласно любому из положений 1-8, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[10] Антитело согласно любому из положений 1-9, где антитело содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

[11] Антитело согласно любому из положений 1-10, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-44 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 45-48, 52-66 и 151-153, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 49, 50 и 67-80; и

переменную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106-115 и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 91-99 и 118-132.

[12] Антитело согласно любому из положений 1-11, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-42 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 46-48, 52-66 и 151-152, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 71, 73, 77 и 79; и

переменную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-83, 85-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106, 108-111, 113-115 и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[13] Антитело согласно любому из положений 1-12, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 18 и 38-44,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 19, 45-48 и 52-66, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 20, 49, 50 и 67-80; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 21, 81-89 и 100-104,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 22, 90 и 106-115, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 23, 91-99 и 118-132.

[14] Антитело согласно любому из положений 1-13, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 18 и 38-42,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 19, 46-48 и 52-66, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 20, 71, 73, 77 и 79; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 21, 81-83, 85-89 и 100-104,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 22, 90, 106, 108-111 и 113-115, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[15] Антитело согласно любому из положений 1-14, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из (1)-(3), и вариабельную область
легкой цепи, выбранную из (4)-(6):

(1) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 18, 38-44 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(2) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 45-48, 52-66 и 151-153, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(3) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 49, 50 и 67-80;

(4) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(5) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106-115 и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

(6) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 91-99 и 118-132.

[16] Антитело согласно любому из положений 1-15, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из (1)-(3), и вариабельную область легкой цепи, выбранную из (4)-(6):

(1) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38-42 и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(2) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 46-48, 52-66 и 151-152, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(3) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID

NO: 20, 71, 73, 77 и 79;

(4) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-83, 85-89, 100-104 и 154,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(5) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106, 108-111, 113-115, и 155-157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

(6) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[17] Антитело согласно любому из положений 1-16, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из (1)-(3), и вариабельную область легкой цепи, выбранную из (4)-(6):

(1) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, 38 и 39

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(2) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, 52 и 66, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(3) вариабельная область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 и 77;

(4) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21 и 85,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(5) вариабельная область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 22, 155 и 157, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и
(6) переменная область легкой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 23 и 95.

[18] Антитело согласно любому из положений 1-17, где антитело содержит
(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 18, 38-44, и 149-150,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
переменную область легкой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
(ii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 19, 45-48, 52-66, и 151-153, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
переменную область легкой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
(iii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
NO: 20, 49, 50 и 67-80, и

переменную область легкой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
(iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 21, 81-89, 100-104 и 154,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (v) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 22, 90, 106-115 и 155-157, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или
 (vi) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 23, 91-99 и 118-132.

[19] Антитело согласно любому из положений 1-18, где антитело содержит
 (i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 18, 38-42 и 149-150,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (ii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 19, 45-48, 52-66 и 151-152, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
 переменную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (iii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 20, 71, 73, 77 и 79, и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 21, 81-83, 85-89, 100-104 и 154,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (v) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 22, 90, 106, 108-111, 113-115 и 155-157, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или
 (vi) переменную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 переменную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[20] Антитело согласно любому из положений 1-19, где антитело содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 22, 90 и 106-115, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или
 (vi) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 23, 91-99 и 118-132.

[21] Антитело согласно любому из положений 1-20, где антитело содержит
 (i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 18 и 38-42,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 19, 46-48 и 52-66, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
 вариабельную область легкой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
 (iii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит
 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
 CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и
 CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID
 NO: 20, 71, 73, 77 и 79, и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 81-83, 85-89 и 100-104,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (v) переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 90, 106, 108-111 и 113-115, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или (vi) переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 93, 95-99, 121, 122, 124, 125, 131 и 132.

[22] Антитело согласно любому из положений 1-21, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

[23] Антитело согласно любому из положений 1-22, где антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, содержащей

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

[24] Антитело согласно положению 1, где антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области легкой цепи,

содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[25] Антитело согласно положению 1 или 24, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 141 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[26] Антитело против hGDF15, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной

последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[27] Антитело против hGDF15, где антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 139 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 141 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[28] Антитело согласно любому из положений 24-27, где аминокислотная модификация от одного до трех аминокислотных остатков представляет собой аминокислотную модификацию одного аминокислотного остатка.

[29] Антитело согласно положению 28, где аминокислотная модификация представляет собой аминокислотную замену.

[30] Антитело согласно положению 28 или 29, где аминокислотная модификация от одного до трех аминокислотных остатков представляет собой замену одного аминокислотного остатка.

[31] Антитело согласно любому из положений 1 и 24-30, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139.

[32] Антитело согласно любому из положений 1 и 24-31, где антитело содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142.

[33] Антитело согласно любому из положений 1 и 24-32, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142.

[34] Антитело согласно любому из положений 1 и 24-33, где антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, и CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134.

[35] Антитело согласно положению 1, где антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области легкой цепи,

содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[36] Антитело согласно положению 1 или 35, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 148 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[37] Антитело против hGDF15, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной

последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

варибельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[38] Антитело против hGDF15, где антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 145 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 148 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

[39] Антитело согласно любому из положений 35-38, где аминокислотная модификация от одного до трех аминокислотных остатков представляет собой модификацию одного аминокислотного остатка.

[40] Антитело согласно положению 39, где аминокислотная модификация представляет собой аминокислотную замену.

[41] Антитело согласно положению 39 или 40, где аминокислотная модификация от одного до трех аминокислотных остатков представляет собой замену одного аминокислотного остатка.

[42] Антитело согласно любому из положений 1 и 35-41, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145.

[43] Антитело согласно любому из положений 1 и 35-42, где антитело содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

[44] Антитело согласно любому из положений 1 и 35-43, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

[45] Антитело согласно любому из положений 1 и 35-44, где антитело содержит CDR1, CDR2, и CDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, и CDR1, CDR2, и CDR3, содержащиеся в варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136.

[46] Антитело согласно любому из положений 1-45, где антитело содержит

варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков.

[47] Антитело против hGDF15, где антитело содержит

варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков;

и

варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием модификации от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5 или от 1 до 3 аминокислотных остатков.

[48] Антитело согласно любому из положений 1-47, где антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[49] Антитело согласно любому из положений 1-48, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием аминокислотной замены, выбранной из H48R, H49R, H49D, H50R, H50S, H50F, H52R, H52Q, H72R, H73D, H73R, H73Y, H119R, H119F, H48S, H71Y, H72A, H72L, H72N, H72T, H72W, H75H, H75L, H75N, H75Q, H79H, H79K, H79Q, H79R, H83R, H117Q, H119E, H119H, H119K, H119N, H119Q, H119S, H119T, H120A, H120D, H120F, H120N, H120Q, H122F, H54T, H54N, H71R, H71H и H77I, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием аминокислотной замены, выбранной из L47R, L48E, L48R, L48S, L48K, L50D, L50R, L50F, L50Y, L73R, L111F, L111Y, L112E, L112R, L112D, L112F, L113D, L113R, L113F, L48H, L48Y, L50Q, L50W, L51Q, L69Y, L70F, L70H, L72D, L72E, L72R, L72Y, L73K, L73N, L73Y, L75Q, L87K, L87N, L111A, L111N, L111S, L112H, L112Q, L112T, L112Y, L113S, L114F, L114H, L114I, L114N, L114Y, L116H, L116Y, L51Y, L72F, L73Q и L74H.

[50] Антитело согласно любому из положений 1-49, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием аминокислотной замены, выбранной из H49R, H49D, H50R, H50S, H50F, H73D, H73R, H73Y, H48S, H71Y, H72A, H72L, H72N, H72T, H72W, H75H, H75L, H75N, H75Q, H79H, H79K, H79Q, H79R, H83R, H119N, H119S, H120F, H120Q, H54T, H54N, H71R и H71H, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием аминокислотной замены, выбранной из L47R, L48E, L48R, L48K, L50D, L50R, L50F, L50Y, L73R, L112E, L112D, L112F, L113D, L113R, L113F, L48H, L48Y, L50Q, L50W, L51Q, L70F, L72D, L72E, L72R, L72Y, L73N, L73Y, L75Q, L112H, L112Q, L112Y, L113S, L116H, L116Y, L51Y, L72F, L73Q и L74H.

[51] Антитело согласно любому из положений 1-50, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием аминокислотной замены, выбранной из H49R, H49D, H48S, H71Y, H83R и H120F, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием аминокислотной замены, выбранной из L48K, L112D, L72F и L74H.

[52] Антитело согласно любому из положений 1-51, где антитело конкурирует за

связывание hGDF15 с антителом против hGDF15, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[53] Антитело согласно любому из положений 1-52, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0086]

[54] Антитело против hGDF15, где антитело конкурирует за связывание hGDF15 с антителом согласно любому из положений 1-53.

[55] Антитело согласно положению 54, где антитело конкурирует с антителом против hGDF15, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[56] Антитело согласно положению 54 или 55, где антитело снижает концентрацию GDF15 в крови.

[57] Антитело согласно любому из положений 54-56, где антитело подавляет расщепление про-GDF15.

[58] Антитело согласно любому из положений 54-56, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0087]

[59] Полинуклеотид, кодирующий антитело согласно любому из положений 1-58.

[60] Полинуклеотид согласно положению 59, где полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 24 и/или последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25.

[61] Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид согласно положению 59 или 60.

[62] Трансформированная клетка, содержащая полинуклеотид согласно положению 59 или 60.

[0088]

[63] Фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно любому из положений 1-58.

[64] Фармацевтическая композиция согласно положению 63, где фармацевтическая композиция предназначена для лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15.

[65] Фармацевтическая композиция согласно положению 64, где заболевание или симптом, ассоциированные с GDF15, представляют собой злокачественную опухоль.

[66] Фармацевтическая композиция согласно положению 64, где заболевание или симптом, ассоциированные с GDF15, представляют собой кахексию.

[67] Фармацевтическая композиция согласно положению 66, где кахексия представляет собой кахексию при злокачественной опухоли.

[68] Фармацевтическая композиция согласно положению 63, где фармацевтическая композиция предназначена для снижения концентрации GDF15 в крови.

[0089]

[69] Антитело согласно любому из положений 1-58 для применения для лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15.

[70] Антитело согласно любому из положений 1-58 для применения для снижения концентрации GDF15 в крови.

[71] Способ лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15, включающий введение эффективного количества антитела согласно любому из положений 1-58 индивидууму, нуждающемуся в этом.

[72] Способ снижения концентрации GDF15 в крови, включающий введение эффективного количества антитела согласно любому из положений 1-58 индивидууму, нуждающемуся в этом.

[73] Применение антитела согласно любому из положений 1-58 для производства лекарственного средства для лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15.

[74] Применение антитела согласно любому из положений 1-58 для производства лекарственного средства для снижения концентрации GDF15 в крови.

[0090]

Настоящее изобретение далее описано с помощью следующих примеров, но не ограничивается этими примерами никоим образом.

Примеры

[0091]

I. Получение антител (1)

A. Получение антитела против hGDF15

1. Иммунизация животных

Схема

Сутки 1; первоначальная иммунизация (25 мкг/инъекция/организм, Abisco-100, в/б)

Сутки 10; вторая иммунизация (25 мкг/инъекция/организм, Abisco-100, в/б)

Сутки 17; третья иммунизация (25 мкг/инъекция/организм, Abisco-100, в/б)

Сутки 21; проверка титра

Сутки 24; конечная бустерная иммунизация (25 мкг/инъекция/организм, Abisco-100, в/б)

Сутки 27; спленэктомия, слияние клеток

Реагенты

- Рекомбинантный GDF15 человека (rhGDF15), R&D, 957-GD-025/CF, 25 мкг

- Abisco-100 (ISCONOVA)

Животные

- 3H/HeJ Jms Slc-lpr/lpr (5W, Japan SLC, самки)

[0092]

Методики

1. Пятьдесят мкл hGDF15 (0,5 мг/мл), 25 мкл Abisco-100 и 175 мкл PBS смешивали и вводили внутривенно мышам (первоначальная иммунизация).
2. Через десять и семнадцать суток после первоначальной иммунизации проводили внутривенное введение раствора hGDF15, полученного аналогично раствору для первоначальной иммунизации.
3. Через двадцать одни сутки после первоначальной иммунизации проводили взятие крови из хвоста мыши с использованием капиллярной пробирки для взятия крови и получали плазму посредством центрифугирования.
4. Плазму разбавляли в 100 раз, в 1000 раз и в 10000 раз и проводили ELISA с использованием 96-луночного планшета, на котором был иммобилизован hGDF15. Было подтверждено, что титр антитела к hGDF15 возрастал.
5. Через двадцать четыре дня после первоначальной иммунизации проводили внутривенное введение раствора hGDF15, полученного аналогично раствору для первоначальной иммунизации.
6. Через двадцать семь суток после первоначальной иммунизации селезенку удаляли под анестезией и проводили слияние клеток.

[0093]

2. Слияние клеток и селекция с HAT

Клетки

- Sp2/o-14Ag (далее в настоящем описании обозначаемые как клетки Sp2/o, ATCC # CRL-1581)

Субкультура, не превышающая 3×10^5 клеток/мл

Реагенты

- DMEM (GIBCO, 10313-021)
- FBS (инактивированная при 56°C в течение 30 минут)
- Пенициллин-стрептомицин-глутамин (Invitrogen, 10378-016)
- Инсулин (Funakoshi, BT-243), полученный в концентрации 10 мг/мл
- 55 mM 2-меркаптоэтанол (1000×) (Invitrogen, 21985-023)
- rIL-6
- PBS
- раствор Тюрка
- трипановый синий
- буфер для лизиса эритроцитов (SIGMA, R7757)
- PEG1500 (Roche, 108014)
- добавка к среде HAT (50×) Hybri-Max (SIGMA, H0262)
- добавка к среде HT (50×) Hybri-Max (SIGMA, H0137)

Оборудование

- 6-луночный планшет (BD, 353046)
- большая колба для культивирования неприкрепленных клеток

- хирургический пинцет (3)
- хирургические ножницы (3)
- 50-мл пробирка Falcon
- 1-мл шприц
- игла для инъекций 23G
- клеточное сито, 40 мкм (BD, 352340)

Состав среды

- среда для культивирования Sp2/o

DMEM: 500 мл

FBS: 55 мл (конечная 10%)

пенициллин-стрептомицин-глутамин (100×): 5 мл (конечная 1×)

- Среда для слияния клеток

DMEM

- Среда для гибридомы

DMEM: 500 мл

FBS: 55 мл (конечная 10%)

Пенициллин-стрептомицин-глутамин (100×): 5 мл (конечная 1×)

2ME: 500 мкл (конечная 0,1%)

Инсулин (10 мг/мл): 250 мкл (конечная 5 мкг/мл)

гIL-6: в соответствующих случаях (конечная 5 нг/мл)

- селективная среда НАТ

Среда для гибридомы

50× НАТ в соответствующих случаях (конечная 1×)

[0094]

Методики

- Подготовка миеломы (за 1 неделю до слияния клеток)

1. Криоконсервированные клетки Sp2/o (приблизительно 1×10^6 клеток/флакон) размораживали и суспендировали в 10 мл среды Sp2/o, предварительно внесенной в 15-мл пробирку falcon. Суспензию центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 минут для промывания и супернатант удаляли.

2. Осадок (клетки Sp2/o) суспендировали в 4 мл среды Sp2/o.

3. Подготавливали 6-ячеечный планшет, содержащий 4 мл среды для Sp2/o в каждой лунке, и суспензию клеток Sp2/o, полученную согласно стадии 2, выше, разбавляли в серии 2-кратных разведений.

4. Клетки культивировали при 37°C под 5,5% CO₂ в течение 1-2 суток.

5. Клетки в хорошем состоянии согласно микроскопической оценке собирали, и культивировали и подвергали экспансии в большой колбе (или колбе среднего размера) для культивирования неприкрепленных клеток. Клетки пассивировали за 2 суток до слияния клеток (в день слияния клеток плотность клеток доводили до приблизительно 5×10^5 клеток/мл).

[0095]

- Извлечение селезенки из мыши

1. Мышь подвергали анестезии, тщательно опрыскивали 70% этанолом, а затем подвергали лапаротомии в ламинарном боксе. Для асептического извлечения селезенки, пинцет и ножницы для наружного применения на коже и пинцет и ножницы для внутрибрюшинной операции были стерилизованными.

2. После тотального взятия крови из брюшной аорты под анестезией селезенку извлекали.

3. Селезенку помещали в 50-мл пробирку falcon, предварительно заполненную PBS, и помещали на лед до слияния клеток.

[0096]

- Слияние клеток (получение гибридомы)

DMEM (бессывороточная) и ПЭГ предварительно нагревали в инкубаторе при 37°C и проводили следующие действия.

1. Клетки Sp2/o собирали и подсчитывали количество клеток. Использовали только клетки во флаконах с 1×10^6 клеток/мл или менее.

2. Приблизительно 10 мл PBS добавляли к в одну ячейку 6-ячеечного планшета falcon, в нее помещали извлеченную селезенку, а оставшуюся жировую ткань удаляли.

3. Свежие 10 мл PBS помещали в одну из оставшихся ячеек и селезенку переносили в эту ячейку. Селезенку разрезали пополам с использованием стерильного пинцета и ножниц.

4. Иглу 23G подсоединяли к 1-мл шприцу для аспирирования PBS, и PBS инъецировали в селезенку, разрезанную пополам, так что спленоциты выталкивались в PBS. Выталкивание повторяли до тех пор, пока селезенка не становилась белой.

5. Стерилизованное сито устанавливали сверху 50 мл пробирки falcon, и PBS, содержащий спленоциты, пропускали через сито, так чтобы происходило удаление тканей, отличных от спленоцитов. Добавляли среду для слияния клеток, чтобы общий объем составлял 40 мл.

6. Полученную смесь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 минут и супернатант удаляли.

7. Клетки селезенки суспендировали в 20 мл среды для слияния клеток и окрашивали раствором Тюрка (раствор Тюрка: суспензия=10:1) и лейкоциты подсчитывали (как правило, количество составляло приблизительно 1×10^8 клеток, или 5×10^6 клеток/мл).

8. Полученный раствор центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 минут и супернатант удаляли.

9. Клетки суспендировали в 3 мл буфера для лизиса эритроцитов и оставляли на льду на 3 минуты.

10. К суспензии добавляли 17 мл среды для слияния клеток и полученный раствор центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 минут для сбора спленоцитов.

11. К спленоцитам добавляли среду, содержащую клетки Sp2/o, в количестве, чтобы соотношение спленоциты: клетки Sp2/o составляло 5:1 по количеству клеток, с получением суспензии.

12. Суспензию центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 минут и ее супернатант удаляли.

13. Преципитированные клетки ресуспендировали путем постукивания.

14. Добавляли один мл PEG1500 в течение 1 минуты при осторожном перемешивании.

15. Перемешивание продолжали в течение еще 1 минуты.

16. Аналогично тому, как на стадии 14, капельно добавляли 1 мл среды для слияния клеток.

17. Кроме того, добавляли 3 мл среды для слияния клеток на протяжении 3 минут.

18. Затем добавляли 10 мл среды для слияния клеток в течение 1 минуты.

19. Полученную смесь оставляли при 37°C на 10 минут.

20. Добавляли среду для слияния клеток, так чтобы общий объем составлял 40 мл.

21. Полученную смесь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 минут и супернатант удаляли.

22. Преципитированные клетки суспендировали в среде для гибридомы, так чтобы количество спленоцитов составляло 1×10^6 клеток на мл, и гибридомы высевали в 96-луночный планшет с плоским дном в количестве 100 мкл на лунку.

23. Гибридомы культивировали в течение ночи при 37°C под 5,5% CO₂.

24. Добавляли 2× среду для селекции с НАТ в количестве 100 мкл/лунка, и продолжали культивирование клеток.

25. Среду заменяли удалением 100 мкл супернатанта раз в двое суток добавлением 100 мкл 1× среды для селекции с НАТ.

[0097]

3. Скрининг антител

Гибридомы, продуцирующие антитела hGDF15, отбирали следующим образом на основе силы связывания с hGDF15 при определении посредством ELISA с использованием супернатанта гибридом через 5 суток после начала культивирования в 96-луночном планшете.

[0098]

В 96-луночный планшет, на котором был иммобилизован hGDF15 (R&D Systems, 957-GD-025/CF) добавляли 100 мкл/лунка культурального супернатанта и подвергали реакции при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывания лунок добавляли вторичное антитело для детекции (меченное HRP антитело против IgG мыши (Promega, W402B)) и подвергали реакции при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания лунок добавляли раствор TMB (Sigma, T2885) для развития окраски и проводили измерение поглощения при 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов.

[0099]

Гибридомы в лунках, продемонстрировавшие поглощение при 450 нм 1,0 или выше, далее подвергали преобразованию в моноклоны посредством лимитирующего разведения. Наконец, было получено 16 клонов. Из 16 полученных клонов 13 клонов культивировали, за исключением одного клона, который был с IgM, и двух клонов, которые продемонстрировали неспецифическое связывание с несколькими белками.

[0100]

Антитела очищали из культурального супернатанта с использованием HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare Life Sciences, 17508001). Концентрацию очищенного антитела определяли с использованием NanoDrop (Thermo Scientific) по поглощению при 280 нм.

[0101]

Аффинность связывания каждого очищенного антитела с hGDF15 определяли посредством ELISA следующим образом. hGDF15 в концентрации 200 нг/мл добавляли в лунки в количестве 100 мкл/лунка. 96-луночный планшет, на котором был иммобилизован hGDF15, подвергали реакции с очищенным антителом, подвергнутому серийному разведению от 0,39 нг/мл до 25 нг/мл, в количестве 100 мкл/лунка, а затем проводили детекцию комплекса hGDF15-антитело против hGDF15 с использованием конъюгированного с HRP вторичного антитела. Для детекции развития окраски проводили измерение поглощения при 450 нм и вычисляли величину при количестве антитела 5 нг/мл с использованием 4-параметрической логистической кривой. Величина связывания каждого антитела представляла собой относительную величину, вычисленную путем принятия величины для клона MAB17 за 100.

[0102]

В таблице 1 представлены результаты аффинности между hGDF15 и полученным антителом против hGDF15. MAB2, которое продемонстрировало значительно более высокое связывание, чем MAB17, подвергали гуманизации.

Таблица 1

Клон	Относительная величина, когда величина MAB17 была принята за 100
MAB3	72,3
MAB4	44,2
MAB5	36,4
MAB6	68,1
MAB1	33,6
MAB11	12,0
MAB12	36,2
MAB13	50,1
MAB7	3,1

MAB15	25,1
MAB14	26,4
MAB17	100,0
MAB2	350,9

[0103]

4. Получение гуманизированного антитела

- Клетки

Наименование клеточной линии: ExpiCHO

Происхождение: китайский хомячок

Источник клеток: Thermo Fisher Scientific (A29127)

Раствор для культивирования: среда для экспрессии ExpiCHO

Источник раствора для культивирования: Thermo Fisher Scientific (A2910001)

[0104]

- Экспрессирующий вектор

Наименование вектора: pcDNA-3.1

Происхождение кДНК: тотальный синтез

Источник: Thermo Fisher Scientific

[0105]

- Рекомбинантный белок

Наименование белка: GDF15 человека

Происхождение: клетки CHO

Источник: R&D systems (957-GD-025/CF)

[0106]

- Конструирование химерной последовательности антитела

Вариабельную область, содержащую последовательности CDR из MAB2, которое происходит из мыши, и константную область бевацизумаба соединяли с получением химерной последовательности антитела.

[0107]

- Конструирование последовательности гуманизированного антитела

Проводили поиск антитела человека с высоким сходством с MAB2 посредством поиска Blast. Последовательности CDR антитела человека заменяли последовательностями MAB2 с получением вариабельной области, и вариабельную область объединяли с константной областью бевацизумаба с получением полноразмерного гуманизированного антитела. Аминокислоты антитела мыши, которые считали важными для поддержания его структуры в соответствии с прогнозированием структуры, сохраняли и использовали в качестве части гуманизированного антитела.

[0108]

- Получение и очистка антитела

Гены тяжелой и легкой цепей полностью синтезировали и включали в

экспрессирующие векторы, соответственно. Клетки ExpiCHO высевали на 24-ячеечный планшет и на следующие сутки векторы, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи, сотрансфицировали с использованием набора TransIT-CHO (Takara, V2170), для совместной экспрессии тяжелой и легкой цепей. Через 5 суток весь полученный культуральный супернатант, содержащий антитело, собирали и антитело очищали с использованием колонки Hitrap rProteinA FF (GE healthcare, 17-5080-01).

[0109]

- Измерение концентрации антитела

Концентрацию антитела в супернатанте измеряли с использованием набора EIA для IgG человека (Takara, MK136) в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. Концентрацию очищенного антитела определяли путем измерения поглощения при 280 нм с использованием NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

[0110]

- Измерение величины связывания с hGDF15 (ELISA)

100 мкл раствора GDF15 человека (0,4 мкг/мл) добавляли в 96-луночный планшет и оставляли до следующего утра для подготовки планшета для ELISA. Блокирование планшета проводили посредством 1% BSA в течение 1 часа. Получали серию разведений культурального супернатанта, содержавшего антитела, имевшую знаменатель прогрессии 3, и 100 мкл каждого из них добавляли в планшет для ELISA и оставляли на 2 часа. Для реакции с вторичным антителом добавляли 100 мкл разбавленного раствора конъюгированного с HRP антитела против IgG человека (Gene Tex, GTX26759) (в 20000 раз) и подвергали реакции в течение 1 часа. Для реакции развития окраски использовали TMB (Sigma, T-0440) и для остановки реакции использовали 2 Н серную кислоту. Измерение поглощения проводили при 450 нм.

[0111]

- Измерение аффинности связывания с использованием BLITZ

Аффинность связывания антитела определяли с использованием BLITZ (Pall ForteBio), который представляет собой систему для анализа биомолекулярных взаимодействий. В качестве сенсорного чипа использовали Anti-HIS (Pall ForteBio, 18-5114) и в качестве раствора для промывания использовали разбавитель для образца ForteBio (Pall ForteBio, 18-1048). Программа для измерения была установлена на 60 секунд для адсорбции hGDF15 на сенсорный чип, 120 секунд для связывания антитела и 120 секунд для диссоциации.

[0112]

В. Секвенирование

1. Способы тестирования

Тотальную РНК получали из гибридомы, культивированной в 10-см чашке Петри, и синтезировали кДНК с использованием набора SMARTer RACE 5'/3'Kit (Takara, 634858). Синтезированную кДНК включали в вектор pCR4Blunt-TOPO и амплифицировали с использованием *Escherichia coli*, и плазмидную ДНК очищали. Секвенирование ДНК

проводили с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, 4337454) и праймера M13 на анализаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

[0113]

2. Результаты

Аминокислотные последовательности MAB17, MAB2 и HuMAB2 представлены в таблице 2, последовательности CDR этих антител представлены в таблице 3, и последовательности кДНК HuMAB2 представлены в таблице 4. CDR были идентифицированы на основе определения Kabat.

Таблица 2-1

Наименование антитела	Наименование последовательности (наименование вектора)	Аминокислотная последовательность (Последовательность CDR подчеркнута)	SEQ ID NO:
MAB2	Вариабельная область Н-цепи	MRMLSVLYLLSALPGILSDVQLQESGPSL VRPSQTLSLTCTVTGFSINSDCYWIWIRQ FPGNKLEYIGYTFYSGITYYNPSLASRTY ITRDTSKNQFSLKLNSVTTEDTATYYCAR DCDYAMDYWGQGTSVTVS	4
	Вариабельная область L-цепи	MGYSAQFLGLLLLCFQGTQCDIQMTQTTS SLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQ KPDGTVKLLIH YTSTLHSGVPSRFS SGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQOGNTLPW TEGGGKLEIKRADA	5
MAB17	Вариабельная область Н-цепи	MDRLTFSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPG ILQPSQTLSLTCSFSGFSLNTHGMGVGWI RQPSGKGLEWLANIWWNDKYYNSALKSR LTLSKDTSNNOVFLKISSVDTADTATYFC AQVANDWFAYWGQGLVTIS	6
	Вариабельная область L-цепи	MDSQVQIFSFLISASVILSRGQIVLTQS PAIMSASLGEEITLTCSASSSVRYMHWYQ QKSGTSPKVLIIYSTSNLASGVPSRFSGSG SGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYP WTEGGGKLEIKRADA	7

Таблица 2-2

Наименование антитела	Наименование последовательности (наименование вектора)	Аминокислотная последовательность (Последовательность CDR подчеркнута)	SEQ ID NO:
HuMAВ2	Вариабельная область Н-цепи	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSIN <u>SDCYWIWIRQ</u> PPGKGLEIYIG <u>YTFYSGITYYNPSLAS</u> RTT ISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>DCDYAMDYWG</u> QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSG	8
	Вариабельная область L-цепи	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPS SLSASVGDRVITITC <u>RASQDISNYLNWYQQ</u> KPGKAVKLLIH <u>YTSTLHSGVPSRFS</u> SGSGS GTDYTLTISSLPEDFATYFC <u>QQGNTLPW</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI</u> FPF	9
	Н-цепь полноразмерная (H3delK)	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSIN <u>SDCYWIWIRQ</u> PPGKGLEIYIG <u>YTFYSGITYYNPSLAS</u> RTT ISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>DCDYAMDYWG</u> QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	10
	L-цепь полноразмерная (L7)	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPS SLSASVGDRVITITC <u>RASQDISNYLNWYQQ</u> KPGKAVKLLIH <u>YTSTLHSGVPSRFS</u> SGSGS GTDYTLTISSLPEDFATYFC <u>QQGNTLPW</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI</u> FPFSD EQLEKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	11

Таблица 3

Наименование антитела	Цепь	Номер CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
MAB17	H	CDR-H1	THGMGVG	12
	H	CDR-H2	NIWWNDDKYNSALKS	13
	H	CDR-H3	VAWDWFAY	14
	L	CDR-L1	SASSSVRYMH	15
	L	CDR-L2	STSNLAS	16
	L	CDR-L3	HQWSSYPWT	17
MAB2 HuMAB2	H	CDR-H1	SDCYWI	18
	H	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSLAS	19
	H	CDR-H3	DCDYAMDY	20
	L	CDR-L1	RASQDISNYLN	21
	L	CDR-L2	YTSTLHS	22
	L	CDR-L3	QQGNTLPWT	23

Таблица 4-1

Наименование антитела	Наименование последовательности (наименование вектора)	Последовательность кДНК	SEQ ID NO:
HuMAB2	Вариабельная область Н-цепи	ATGAAGCACCTGTGGTTTTCTGCTGCTGCTGGCCGC TCCCAGATGGGTGCTGTCTCAGGTGCAGCTGCAGG AATCTGGCCCTGGCCTCGTGAAGCCCAGCGAGACA CTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGCCTTCAGCAT CAACAGCGACTGCTACTGGATCTGGATCAGACAGC CCCCTGGCAAGGCCCTGGAGTACATCGGCTACACC TTCTACAGCGGCATCACCTACTACAACCCCAGCCT GGCCAGCCCGACCACCATCAGCAGACACACCACCA AGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACA GCCGCCGATACCGCCGTGTACTACTGCCGCCAGAGA CTGCCACTACGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGC CCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGAG CACATCTGGC	24
	Вариабельная область L-цепи	ATGAGAGTGCCTGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCT GCTGTGGCTGCCTGGCGCTAGATGCCACATCCAGA TGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTG GGCGACAGAGTGACCATCACCTGTACAGCCAGCCA GGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGA AACC CGGCAAGGCCGTGAAGCTGCTGATCCACTAC ACCAGCACCTGCACAGCGGCGTGGCCAGCAGATT TTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGA CAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACC TACTTCTGTGACGAAGGCAACACCCCTGCCCTGGAC CTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGA CAGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCACTCTCCCACT	25

Таблица 4-2

Наименование антитела	Наименование последовательности (наименование вектора)	Последовательность кДНК	SEQ ID NO:
HumAB2	Н-цепь полно-размерная (H3delK)	ATGAAGCACCTGTGGTTTCTGCTGCTGCTGGCCGC TCCCAGATGGGTGCTGTCTCAGGTGCAGCTGCAGG AATCTGGCCCTGGCCCTCGTGAAGCCAGCGAGACA CTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCAT CAACAGCGACTGCTACTGGATCTGGATCAGACAGC CCCCGGCAAGGGCCCTGGACTACATCGGCTACACC TTCTACAGCGGCATCACCTACTACAACCCAGCCT GGCCAGCCGGACCACCATCAGCAGAGACACCAGCA AGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACA GCCGCCGATACCGCCGTGTACTACTGCCGCCAGAGA CTGCGACTACGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGC CCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGAG CACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCG TGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCCGTGACAGTGTCC TGGAACCTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGACAC CTTTCCAGCCCTGCTGCACAGCAGCCGCCCTGTACT CTCTGTCCAGCGTCTGTGACTGTGCCCAGCAGCTCT CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGG AACCCAAAGAGCTGGGACAAAGACCCACACCTGTCCC CCTTGTCCTGCCCCCGAAGTGTGGGAGGCCCTTC CGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAAGCCCCAAGGACACCC TGATGATCAGCAGAACCCCCGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCTGAAGTGAA GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACA ACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAAC AGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCT GCACCAGSACTGCCTGAACGGCAAAGAGTACAAGT GCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAGCCCCG CCAGCCCCAGCTGTACACACTGCCTCCAAGCCCGG AAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACATGC CTCGTGAAGGCCCTTCTACCCCTCCGATATTGCCCT GGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGC TCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCTAA	26

Таблица 4-3

Наименование антитела	Наименование последовательности (наименование вектора)	Последовательность КДНК	SEQ ID NO:
HuMAB2	L-цепь полно-размерная (L7)	ATGAGAGTGCCTGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCT GCTGTGGCTGCCTGGCGCTAGATCCGACATCCAGA TGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTG GCGGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCC GGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGA AACCCGGCAAGGCCGTGAACTGCTGATCCACTAC ACCAGCACCCCTGCACAGCGCGTGCCCAGCAGATT TTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCCTGA CAATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCTACC TACTTCTGTGAGCAAGGCAACACCCCTGCCCTGGAC CTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGA CAGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTATCTTCCACCT AGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGG CCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG TCCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGTCTTCCACCC TGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGAG CAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGT GCTGA	27

[0114]

С. Сравнение с существующими антителами против hGDF15

1. Тестируемые материалы и способы

Антитело против hGDF15

В таблице 5 представлены антитела, использованные для сравнения реактивности в отношении HuMAB2.

Таблица 5

Наименование антитела	Тип
MAB17	мыши, моноклональное
MAB3	мыши, моноклональное
MAB4	мыши, моноклональное
MAB5	мыши, моноклональное
MAB6	мыши, моноклональное
MAB1	мыши, моноклональное
MAB11	мыши, моноклональное
MAB12	мыши, моноклональное
MAB13	мыши, моноклональное
Hu01G06-127 ¹⁾	гуманизированное, моноклональное
MAB957 ²⁾	мыши, моноклональное
Биотинилированное антитело козы против GDF-15 человека для детекции ³⁾ .	козы, поликлональное

1) Гуманизированное антитело против hGDF15 (WO2014/100689)

2) R&D Systems, MAB957, партия №: UDC1014011

3) R&D Systems, DY957

[0115]

Способы тестирования

HuMAB2 и моноклональные антитела против GDF15, представленные в таблице 5 (2 мкг/мл) добавляли в 96-луночные планшеты в количестве 100 мкл/лунка для иммобилизации на планшетах и подвергали реакции с hGDF15 (R&D Systems, 957-GD-025/CF), подвергнутым серийному разведению от концентрации 1 нг/мл, в количестве 100 мкл/лунка. В качестве антитела для детекции использовали HuMAB2, биотинилированное с использованием набора для биотинилирования EZ-Link Micro NHS-PEG4-Biotinylation Kit (Thermo Fisher Scientific, 21955) (1 мкг/мл в количестве 100 мкл/лунка). Определение того, осуществлялся ли сэндвич ELISA, проводили с использованием конъюгата стрептавидин-HRP в наборе ELISA для GDF15 человека (R&D Systems, DY957). В качестве положительного контрольного антитела (PC) для сэндвич-ELISA использовали антитело для детекции в наборе ELISA для GDF15 человека (R&D Systems, DY957) (таблица 5), которое осуществляет сэндвич ELISA с любым моноклональным антителом.

[0116]

2. Результаты

Ожидалось, что конкурентное ингибирование может происходить, когда иммобилизованное антитело и биотинилированное антитело распознают сходные эпитопы, однако конкурентное ингибирование не происходит, когда эти антитела распознают разные эпитопы. Как показано на фиг.1, HuMAB2 было способно распознавать hGDF15 одновременно с другими антителами. Этот результат указывает на то, что HuMAB2 распознает эпитоп, отличный от эпитопов других антител.

[0117]

Как показано выше, было продемонстрировано, что HuMAB2 не конкурирует с каким-либо из существующих антител. Затем тестировали другие антитела, полученные в этот раз, чтобы увидеть, конкурирует ли каждое из этих антител с HuMAB2, тем же способом, как описано выше. Результаты представлены в таблице 6 в качестве % ингибирования. Было обнаружено, что из 8 протестированных клонов 4 клон (MAB1, MAB11, MAB12 и MAB13) ингибируют связывание HuMAB2 и hGDF15 более чем на 70%.

Таблица 6

Результаты конкурентных тестов с индивидуальными моноклональными антителами против hGDF15

Клон	Ингибирование %
MAV3	11
MAV4	46
MAV5	45
MAV6	22
MAV1	82
MAV11	73
MAV12	73
MAV13	79
MAV17	0
HuMAV2	80

[0118]

D. Кристаллизация комплекса hGDF15 и Fab HuMAV2

1 Тестируемые материалы и способы

hGDF15 (R&D Systems, 9279-GD-050) смешивали с Fab HuMAV2 (содержащим полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9) (20 мл Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,2) в молярном соотношении 1:1 с получением раствора белка в концентрации 5 мг/мл. Кристаллизацию HuMAV2 проводили способом диффузии паров в сидячей капле. Соотношение для смешения раствора белка и резервуарного раствора составляло 1:1. С использованием кристаллов, полученных с использованием набора для скрининга Crystal Screen 2 (Hampton Research, HR2-112), определяли кристаллическую структуру комплекса с разрешением 2,8Å. Фазу определяли способом молекулярной подстановки.

[0119]

2. Результаты

Трехмерный структурный анализ продемонстрировал, что hGDF15 образовывал гомотимер, и что с димером hGDF15 связывались две молекулы Fab HuMAV2 (фиг.2A). Аминокислоты, расположенные на поверхности связывания между HuMAV2 и hGDF15, были идентифицированы как составляющие паратоп и эпитоп, соответственно (фиг.2B). Идентифицированный эпитоп hGDF15 и аминокислоты на HuMAV2, которые важные для связывания, подчеркнуты в таблице 7.

Таблица 7

		Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
HuMAB2	варибельная область Н-цепи	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGGLVKPS ETLSLTCTVSGFSINSDCYWIWIRQPPGKLEY IGYTFYSGITYYNPSLASRTTISRDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARDYAMDYWGQGTIVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG	8
	варибельная область L-цепи	MRVPAQLLGLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSA SVGDRVITICRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKL LIHYTSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFFP	9
hGDF15		ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDLLAKDCH CI	2

[0120]

Эпитоп hGDF15, проанализированный с использованием Molecular Operating Environment (MOE), представлен на фиг.3. Было обнаружено, что HuMAB2 связывается с 14 аминокислотами от аспарагиновой кислоты в положении 5 до гистидина в положении 18 на N-конце и изолейцином в положении 45 (45I) и глицином в положении 46 (46G) на одном из мономеров hGDF15 (мономер 1), и с аспарагиновой кислотой в положении 71 (71D) и треонином в положении 72 (72T) на другом мономере (мономер 2).

[0121]

Аминокислотные остатки, предположительно особенно сильно вовлеченные во взаимодействие с HuMAB2 в эпитопе, вычисляли с использованием MOE Protein Contacts (таблица 8). Затем было показано, что аминокислоты, представленные на фиг.3 особенно сильно связываются с HuMAB2.

Таблица 8

Антитело	hGDF15	E (ккал/моль)
L Asn112	Arg13	-6.5
H Asp119	Arg16	-3.4
H Phe71	His6	-1.6
H Tyr69	His6	-1.4
L Asn51	Thr72	-1.2
L Tyr70	Thr72	-1.1
H Ile75	His6	-1.1
H Tyr120	Leu17	-0.91
L Trp116	Gly10	-0.76
H Tyr52	Cys 7	-0.72

* представлены 10 наилучших

[0122]

Е. Реактивность антитела против hGDF15 в отношении hGDF15 и мутантного

hGDF15

1. Тестируемые материалы и способы

Тестируемые материалы

Антитела, использованные для сравнения реактивности с антителом HuMAB2, приведены в таблице 9.

Таблица 9

Наименование антитела	Тип
MAB17	мыши, моноклональное
Hu01G06-127 ¹⁾	гуманизированное, моноклональное
MAB957 ²⁾	мыши, моноклональное
Биотинилированное антитело козы против GDF-15 человека для детекции ³⁾	козы, поликлональное

1) Гуманизированное антитело против hGDF15 (WO2014/100689)

2) R&D Systems, MAB957, партия №: UDC1014011

3) R&D Systems, DY957

[0123]

Способ тестирования

Описание теста

Экспрессирующей конструкцией мутантного hGDF15 трансфицировали клетки ExpiCHO-S. Трансфицированные клетки культивировали и культуральный супернатант собирали. После подтверждения экспрессии каждого мутанта hGDF15 в собранном культуральном супернатанте с использованием коммерчески доступного набора для ELISA для определения GDF15 проводили оценку реактивности HuMAB2 в отношении мутантного hGDF15 посредством ELISA. Аминокислотные остатки, являющиеся особенно важными в эпитопе, идентифицировали посредством оценки реактивности HuMAB2 в отношении мутантного GDF15 двумя способами: посредством ELISA и системы анализа биомолекулярных взаимодействий. Подтверждение различия вследствие различий эпитопов между HuMAB2 и другими антителами против hGDF15 проводили путем сравнения реактивности в отношении мутантного hGDF15 у каждого из других антител против hGDF15 с реактивностью HuMAB2 с использованием сэндвич-ELISA.

[0124]

Получение мутантного hGDF15

Вектор pcDNA-3.1 (Thermo Fisher Scientific), в который был встроен каждый мутантный ген hGDF15, трансфицировали с использованием набора ExpiCHOTM Expression System Kit (Thermo Fisher Scientific, A29133) в клетки ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific), включенные в набор. Культуральный супернатант через 10 суток после трансфекции центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 минут при 4°C и культуральный супернатант собирали. Собранный культуральный супернатант хранили замороженным (установленная температура -20°C).

[0125]

Подтверждение экспрессии мутантного hGDF15

Мутантный hGDF15 в собранном культуральном супернатанте определяли с использованием набора ELISA для GDF15 человека (R&D System, DY957) в соответствии с инструкциями к набору для подтверждения экспрессии и определения концентрации белка.

[0126]

Оценка реактивности антитела против GDF15 в отношении мутантного hGDF15

В качестве hGDF15 дикого типа (Wt) использовали рекомбинантный GDF15 человека (R&D Systems, 957-GD-025/CF). Wt и мутантный hGDF15 подвергали серийному разведению и подвергали реакции с планшетом, на котором было иммобилизовано каждое из антител против hGDF15, и детекцию связанного Wt и мутантного hGDF15 проводили с использованием антитела для детекции в наборе ELISA для GDF15 человека (R&D Systems, DY957) (таблица 9).

[0127]

Оценка реактивности HuMAB2 в отношении мутантного GDF15 посредством системы анализа биомолекулярных взаимодействий

Каждый мутантный hGDF15 очищали с использованием аффинной колонки, в которой MAB17 было иммобилизовано на Sepharose (GE Healthcare, 17-0906-01). Оценку посредством системы анализа биомолекулярных взаимодействий проводили с использованием OCTET QKe (ForteBio). В качестве Wt GDF15 использовали рекомбинантный GDF15 человека (R&D Systems, 957-GD-025/CF). Wt и мутантный hGDF15 связывали с биосенсором Ni-NTA (ForteBio, 18-5101), а затем подвергали реакции с серийными разведениями HuMAB2 для оценки взаимодействия между мутантным hGDF15 и HuMAB2. Анализ проводили с использованием кинетического способа.

[0128]

2. Результаты

Аминокислотные последовательности hGDF15 дикого типа (WT) и мутантного hGDF15 представлены в таблице 10. Положение, где аминокислота hGDF15 дикого типа была заменена на аланин, подчеркнуто.

Таблица 10

	Последовательность	SEQ ID NO:
hGDF15 (WT)	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	2
H6A	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	28
R13A	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	29
R16A	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	30
R13A, R16A	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	31
3A	ARNGDHCPLG PAACCAALHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	32
4A	ARNGDHCPLG PAACCAALHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	33
6A	ARNGDHCPLA AAACCAALHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	34
8A	ARNGDHCPLA AAACCAALHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	35
T72A	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSIHRLKP DAVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDQLLAKDCH C1	36

[0129]

В таблице 11 представлено связывание четырех антител против hGDF15 с hGDF15 и мутантным hGDF15. HuMAB2 не связывалось с мутантным hGDF15, или связывалось, но более слабо, чем с hGDF15 дикого типа. Напротив, мутации не влияли на связывание других антител против hGDF15 с hGDF15. В соответствии с результатами, было обнаружено, что в эпитопе hGDF15 для HuMAB2 5DHCPLGPGRCCRLH18 (SEQ ID NO: 3) на N-конце являются важными для связывания, и 13R и 16R являются особенно важными для связывания HuMAB2. Результаты также подтвердили, что MAB17, Hu01G06-127 и MAB957 имеют эпитопы, отличные от HuMAB2.

Таблица 11

	Антитело против GDF15			
	HuMAB2	MAB17	Hu01G06-127	MAB957
hGDF15 (WT)	100	100	100	100
H6A	136,1±1,4	87,7±5,0	90,5±2,3	88,3±2,6
R13A	17,8±1,4	97,2±0,6	91,4±3,5	89,9±0,5
R16A	24,9±0,9	101,2±4,1	102,0±4,3	93,9±0,8
R13A, R16A	4,9±0,9	83,0±1,0	87,6±3,0	80,6±1,9
3A	0,4±0,2	109,8±1,3	96,2±0,2	99,0±1,6
4A	0,0±0,1	95,0±1,2	83,5±1,3	84,1±0,6
6A	0,0±0,0	83,9±1,9	61,6±0,5	74,3±4,1
8A	-0,1±0,1	78,8±0,2	57,1±0,6	69,2±1,9
T72A	100,9±2,7	104,4±4,4	107,7±6,9	101,2±3,7

Связывание каждого мутантного hGDF15 выражали в качестве относительной величины, когда количество антитела против GDF15, связанное 500 пг/мл hGDF15, принимали за 100. Величина соответствует среднему значению $\pm$ SD.

[0130]

Е. Оценка реактивности антитела HuMAB2 в отношении пептида эпитопной области

1. Способы тестирования

Поскольку было выявлено, что 14 остатков от остатка аспарагина в положении 5 до остатка гистидина в положении 18 hGDF15 (DHCPLGPGRCCRLH, SEQ ID NO: 3) являются важными для связывания HuMAB2, синтезировали пептид с этой последовательностью у GenScript (таблица 12). Пептид 1 был немодифицированным на обоих концах, и пептид 2 синтезировали путем ацетилирования N-конца и амидации C-конца для имитации естественного состояния, поскольку эта область является внутренней областью в hGDF15. В 96-луночный планшет, в который был добавлен раствор пептида 10 мкг/мл в количестве 100 мкл/лунка и пептид иммобилизовался, добавляли антитело HuMAB2 (10 мкг/мл) в количестве 100 мкл/лунка и тем самым подвергали реакции с пептидом (25°C в течение 3 часов). Детекцию связавшегося антитела HuMAB2 проводили путем добавления разбавленного в 5000 раз антитела против IgG человека-HRP (Jackson ImmunoResearch, 109-035-008) в количестве 100 мкл/лунка и подвергали реакции при 25°C в течение 1 часа. В качестве контрольного планшета использовали планшет, на котором был иммобилизован hGDF15 (R&D Systems, 957-GD-025/CF). В качестве положительного контрольного антитела, которое реагирует с пептидом, использовали антитело для детекции в наборе ELISA для GDF15 человека (R&D Systems, DY957) (таблица 9), и в качестве отрицательного контрольного антитела использовали изотипический контрольный IgG1 человека (Abcam, ab206198).

Таблица 12
Синтезированные пептиды

Наименование пептида	Последовательность	Модификация
Пептид 1	DHCFPLGPGRCRLH (SEQ ID NO: 3)	Нет
Пептид 2	DHCFPLGPGRCRLH (SEQ ID NO: 3)	N-концевое ацетилирование и C-концевое амидирование

[0131]

2. Результаты

Как показано на фиг.4, поликлональное антитело против hGDF15, которое представляло собой положительное контрольное антитело, реагировало как с двумя пептидами, так и с hGDF15. Напротив, HuMAB2 реагировало только с hGDF15 и не реагировало с двумя синтетическими пептидами, как и отрицательное контрольное антитело, представляющее собой изотипический контрольный IgG1 человека (hIgG1). Эти результаты указывают на то, что последовательность вокруг эпитопа или конформация являются важными для связывания HuMAB2 с эпитопом hGDF15.

[0132]

G. Связывание с hGDF15 варианта HuMAB2, полученного посредством аминокислотной замены в CDR

1. Тестируемые материалы и способы

Тест-система

Клетки

- 1) Наименование клеточной линии: ExpiCHO
- 2) Происхождение: китайский хомячок
- 3) Источник клеток: Thermo Fisher Scientific (A29127)
- 4) Раствор для культивирования: среда для экспрессии ExpiCHO
- 5) Источник раствора для культивирования: Thermo Fisher Scientific (A2910001)

Экспрессирующий вектор для антитела

- 1) Наименование вектора: pcDNA-3.1
- 2) Происхождение кДНК: тотальный синтез
- 3) Источник: Thermo Fisher Scientific

Рекомбинантный белок

- 1) Наименование белка: GDF15 человека (hGDF15)
- 2) Происхождение: клетки CHO
- 3) Источник: R&D systems (957-GD-025/CF)

[0133]

Способы тестирования

Конструирование экспрессирующего вектора

На основе информации, полученной в результате анализа кристаллической

структуры NuMAB2 и hGDF15, было определено, что аминокислоты на поверхности связывания между антителом и антигеном составляют паратоп или эпитоп, и конструировали экспрессирующие векторы, в которых аминокислотная мутация была внесена в тяжелую или легкую цепь NuMAB2. В таблице 13 представлен перечень вариантов антител (модифицированные аминокислоты подчеркнуты). Области как в тяжелой, так и в легкой цепи расположены в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 от N-конца.

[0134]

Перенос экспрессирующего вектора в клетки

Клетки CHO высевали в 24-луночный планшет и на следующие сутки экспрессирующие векторы тяжелой и легкой цепей варианта антитела, представленного в таблице 13, вводили в комбинации в клетки с использованием набора TransIT-CHO (Takara, V2170). Через 5 суток весь супернатант собирали и хранили в морозильной камере, установленной на -20°C, до применения.

[0135]

Определение величины связывания с hGDF15

100 мкл раствора hGDF15 (0,4 мкг/мл) добавляли в 96-луночный планшет и оставляли при 4°C до следующего утра для подготовки планшета для ELISA. В планшет добавляли 1% BSA для блокирования на 1 час. Получали серию разведений культурального супернатанта, содержавшего вариант антитела, от 30-кратного разведения (знаменатель прогрессии для коэффициента разведения составлял 3), и 100 мкл каждого раствора добавляли в планшет для ELISA и оставляли на 2 часа. В качестве вторичного антитела добавляли конъюгированное с HRP антитело против IgG человека (Gene Tex, GTX26759) (20000-кратное разведение) и оставляли на 1 час. Для реакции развития окраски использовали TMB (Sigma, T-0440), и для остановки реакции использовали 2 N серную кислоту. Поглощение измеряли при 450 нм.

[0136]

Измерение концентрации антитела с использованием OCTET

Концентрацию антитела в культуральном супернатанте определяли с использованием системы анализа биомолекулярных взаимодействий OCTET QKe (Pall ForteBio). Сенсорный чип представлял собой Protein L (Pall ForteBio, 18-5085), раствор для регенерации сенсорного чипа представлял собой 10 mM глицин (pH 1,1), и раствор для промывания представлял собой разбавитель для образца ForteBio (Pall ForteBio, 18-1048). В качестве стандарта использовали IgG из сыворотки человека категории реагентов (Sigma-Aldrich, I12511-10MG) в количестве 50 мг/мл, 10 мг/мл, 1 мг/мл и 0,1 мг/мл, и культуральный супернатант, подлежащий измерению, разбавляли в 2 раза разбавителем для образца (Pall ForteBio, 18-1104) перед применением. В программе для измерения сенсорный чип регенерировали в течение 5 секунд и промывали в течение 5 секунд на протяжении 3 циклов, а затем выбирали проведение измерения концентрации антитела в течение 120 секунд.

[0137]

Сравнение величины связывания с HuMAB2

Величину связывания с hGDF15 человека при 5 нг/мл антитела вычисляли с помощью Excel, и величину связывания каждого варианта антитела выражали в качестве относительной величины, когда количество HuMAB2, связавшее с hGDF15, принимали за 100. Проводили три независимых теста для определения среднего значения $\pm$ стандартная ошибка. Когда антитело не экспрессировалось вследствие мутации, величину связывания принимали за 0. Результаты представлены на фиг.5A-5D.

[0138]

2. Результаты

Было получено пять антител, которые продемонстрировали относительную величину связывания, в 1,5 раза или более превышающую величину связывания HuMAB2. Напротив, для 30 антител наблюдали снижение величины связывания до 50% или менее. Эти два результата для "H50S-L7" представлены на фиг.5A. "Антитело с модифицированной Н-цепью 1/2" было получено с использованием того же вектора для проверки ошибок между лунками в культуре и ELISA. Было показано, что, поскольку оба из них продемонстрировали сходные величины, то тест-система является стабильной.

[0139]

Антитела с вариантом тяжелой цепи H48S-L7, H83R-L7 и H120F-L7, и антитела с вариантом легкой цепи H3-L48K и H3-L112D имели повышение силы связывания приблизительно в 1,5 раза по сравнению с HuMAB2. С другой стороны, поскольку величина связывания была снижена у варианта с глицином в положении 111 (111G) и варианта с лейцином в положении 114 (114L), которые представляли собой варианты легкой цепи HuMAB2, было предположено, что эти аминокислоты составляют важный участок для связывания с hGDF15 и поддержания структуры последовательностей CDR HuMAB2.

[0140]

Таблица 13-1

Наименование антигена	Наименование последовательности		Участок мутации		Последовательность	SEQ ID NO:
	H-цепь	L-цепь	Цепь	Область		
H48R-L7	H48R	L7	H	FR1	DVQLQESGPGGLVKPSETLS LTCTVSGFSI R	37
H49R-L7	H49R	L7	H	CDR-H1	R DCYWI	38
H49D-L7	H49D	L7	H	CDR-H1	D DCYWI	39
H50R-L7	H50R	L7	H	CDR-H1	S RCYWI	40
H50S-L7	H50S	L7	H	CDR-H1	S SCYWI	41
H50F-L7	H50F	L7	H	CDR-H1	S FCYWI	42
H52R-L7	H52R	L7	H	CDR-H1	S DCRWI	43
H52Q-L7	H52Q	L7	H	CDR-H1	S DCQWI	44
H72R-L7	H72R	L7	H	CDR-H2	YTF R SGITYYNPSLAS	45
H73D-L7	H73D	L7	H	CDR-H2	YTFY D GITYYNPSLAS	46
H73R-L7	H73R	L7	H	CDR-H2	YTFY R GITYYNPSLAS	47
H73Y-L7	H73Y	L7	H	CDR-H2	YTFY Y GITYYNPSLAS	48
H119R-L7	H119R	L7	H	CDR-H3	DC R YAMDY	49
H119F-L7	H119F	L7	H	CDR-H3	DC F YAMDY	50
H48S-L7	H48S	L7	H	FR1	DVQLQESGPGGLVKPSETLS LTCTVSGFSI S	51
H71Y-L7	H71Y	L7	H	CDR-H2	YTY Y SGITYYNPSLAS	52
H72A-L7	H72A	L7	H	CDR-H2	YTF A SGITYYNPSLAS	53
H72L-L7	H72L	L7	H	CDR-H2	YTF L SGITYYNPSLAS	54
H72N-L7	H72N	L7	H	CDR-H2	YTF N SGITYYNPSLAS	55
H72T-L7	H72T	L7	H	CDR-H2	YTF T SGITYYNPSLAS	56
H72W-L7	H72W	L7	H	CDR-H2	YTF W SGITYYNPSLAS	57
H75H-L7	H75H	L7	H	CDR-H2	YTFYSG H ITYYNPSLAS	58
H75L-L7	H75L	L7	H	CDR-H2	YTFYSG L ITYYNPSLAS	59
H75N-L7	H75N	L7	H	CDR-H2	YTFYSG N ITYYNPSLAS	60
H75Q-L7	H75Q	L7	H	CDR-H2	YTFYSG Q ITYYNPSLAS	61
H79H-L7	H79H	L7	H	CDR-H2	YTFYSGITYY H PSLAS	62
H79K-L7	H79K	L7	H	CDR-H2	YTFYSGITYY K PSLAS	63
H79Q-L7	H79Q	L7	H	CDR-H2	YTFYSGITYY Q PSLAS	64
H79R-L7	H79R	L7	H	CDR-H2	YTFYSGITYY R PSLAS	65
H83R-L7	H83R	L7	H	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSL R S	66

Таблица 13-2

Наименование антигена	Наименование последовательности		Участок мутации		Последовательность	SEQ ID NO:
	H-цепь	L-цепь	Цепь	Область		
H117Q-L7	H117Q	L7	H	CDR-H3	QCDYAMDY	67
H119E-L7	H119E	L7	H	CDR-H3	DCEYAMDY	68
H119H-L7	H119H	L7	H	CDR-H3	DCHYAMDY	69
H119K-L7	H119K	L7	H	CDR-H3	DCRYAMDY	70
H119N-L7	H119N	L7	H	CDR-H3	DCNYAMDY	71
H119Q-L7	H119Q	L7	H	CDR-H3	DCQYAMDY	72
H119S-L7	H119S	L7	H	CDR-H3	DCSYAMDY	73
H119T-L7	H119T	L7	H	CDR-H3	DCTYAMDY	74
H120A-L7	H120A	L7	H	CDR-H3	DCDAAMDY	75
H120D-L7	H120D	L7	H	CDR-H3	DCDDAMDY	76
H120F-L7	H120F	L7	H	CDR-H3	DCDFAMDY	77
H120N-L7	H120N	L7	H	CDR-H3	DCDNAMDY	78
H120Q-L7	H120Q	L7	H	CDR-H3	DCDQAMDY	79
H122F-L7	H122F	L7	H	CDR-H3	DCDYAFDY	80
H3-L47R	H3delK	L47R	L	CDR-L1	RASRDISNYLN	81
H3-L48E	H3delK	L48E	L	CDR-L1	RASQETISNYLN	82
H3-L48R	H3delK	L48R	L	CDR-L1	RASQRISNYLN	83
H3-L48S	H3delK	L48S	L	CDR-L1	RASQSISNYLN	84
H3-L48K	H3delK	L48K	L	CDR-L1	RASQKISNYLN	85
H3-L50D	H3delK	L50D	L	CDR-L1	RASQDIDNYLN	86
H3-L50R	H3delK	L50R	L	CDR-L1	RASQDIRNYLN	87
H3-L50F	H3delK	L50F	L	CDR-L1	RASQDIFNYLN	88
H3-L50Y	H3delK	L50Y	L	CDR-L1	RASQDIYNYLN	89
H3-L73R	H3delK	L73R	L	CDR-L2	YTSRLHS	90
H3-L111F	H3delK	L111F	L	CDR-L3	QQENTLPWT	91
H3-L111Y	H3delK	L111Y	L	CDR-L3	QQYNTLPWT	92
H3-L112E	H3delK	L112E	L	CDR-L3	QQGETLPWT	93
H3-L112R	H3delK	L112R	L	CDR-L3	QQGRTLPWT	94
H3-L112D	H3delK	L112D	L	CDR-L3	QQGDTLPWT	95
H3-L112F	H3delK	L112F	L	CDR-L3	QQGFTLPWT	96
H3-L113D	H3delK	L113D	L	CDR-L3	QQGNDLPWT	97
H3-L113R	H3delK	L113R	L	CDR-L3	QQGNRLPWT	98
H3-L113F	H3delK	L113F	L	CDR-L3	QQGNFLPWT	99
H3-L48H	H3delK	L48H	L	CDR-L1	RASQHISNYLN	100
H3-L48Y	H3delK	L48Y	L	CDR-L1	RASQYISNYLN	101
H3-L50Q	H3delK	L50Q	L	CDR-L1	RASQDIQNYLN	102
H3-L50W	H3delK	L50W	L	CDR-L1	RASQDIWNYLN	103
H3-L51Q	H3delK	L51Q	L	CDR-L1	RASQDISQYLN	104

Таблица 13-3

Наименование антитела	Наименование последовательности		Участок мутации		Последовательность	SEQ ID NO:
	H-цепь	L-цепь	Цепь	Область		
H3-L69Y	H3delK	L69Y	L	FR2	WYQQKPGKAVKLLI Y	105
H3-L70F	H3delK	L70F	L	CDR-L2	F TSTLHS	106
H3-L70H	H3delK	L70H	L	CDR-L2	H TSTLHS	107
H3-L72D	H3delK	L72D	L	CDR-L2	Y T DTLHS	108
H3-L72E	H3delK	L72E	L	CDR-L2	Y T ETLHS	109
H3-L72R	H3delK	L72R	L	CDR-L2	Y T RTLHS	110
H3-L72Y	H3delK	L72Y	L	CDR-L2	Y T YTLHS	111
H3-L73K	H3delK	L73K	L	CDR-L2	Y T SKLHS	112
H3-L73N	H3delK	L73N	L	CDR-L2	Y T SNLHS	113
H3-L73Y	H3delK	L73Y	L	CDR-L2	Y T SYLHS	114
H3-L75Q	H3delK	L75Q	L	CDR-L2	Y T STL Q S	115
H3-L87K	H3delK	L87K	L	FR3	GVPSRFSGSG K GTDYTLTI SSLQPEDFATYFC	116
H3-L87N	H3delK	L87N	L	FR3	GVPSRFSGSG N GTDYTLTI SSLQPEDFATYFC	117
H3-L111A	H3delK	L111A	L	CDR-L3	QQ A NTLPWT	118
H3-L111N	H3delK	L111N	L	CDR-L3	QQ N NTLPWT	119
H3-L111S	H3delK	L111S	L	CDR-L3	QQ S NTLPWT	120
H3-L112H	H3delK	L112H	L	CDR-L3	QQ C HTLPWT	121
H3-L112Q	H3delK	L112Q	L	CDR-L3	QQ G QTLPWT	122
H3-L112T	H3delK	L112T	L	CDR-L3	QQ G TTLPWT	123
H3-L112Y	H3delK	L112Y	L	CDR-L3	QQ G YTLPWT	124
H3-L113S	H3delK	L113S	L	CDR-L3	QQG N SLPWT	125
H3-L114F	H3delK	L114F	L	CDR-L3	QQGNT F LPWT	126
H3-L114H	H3delK	L114H	L	CDR-L3	QQGNT H LPWT	127
H3-L114I	H3delK	L114I	L	CDR-L3	QQGNT I LPWT	128
H3-L114N	H3delK	L114N	L	CDR-L3	QQGNT N LPWT	129
H3-L114Y	H3delK	L114Y	L	CDR-L3	QQGNT Y LPWT	130
H3-L116H	H3delK	L116H	L	CDR-L3	QQGNTLP H T	131
H3-L116Y	H3delK	L116Y	L	CDR-L3	QQGNTLP Y T	132

[0141]

II. Фармакологический тест (1)

A. Улавливание hGDF15 в крови

1. Тестируемые материалы и способы

Животные

1) Вид/линия: мышь/BALB-c Slc-nu/nu

2) Микробиологическая категория: свободные от особых патогенов (SPF)

3) Источник: Japan SLC

4) Пол: самки

5) Возраст в неделях: 6 недель (на момент введения hGDF15 или антитела)

6) Условия содержания

Животных содержат в следующих условиях.

a) Температура: $23 \pm 2^\circ\text{C}$ b) Влажность: $60 \pm 10\%$

c) Освещение: время освещения: с 7:00 до 19:00

время без освещения: с 19:00 до 7:00

d) пища и вода: свободный прием, CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.), водопроводная вода

[0142]

Схема тестирования

В таблице 14 представлена схема тестирования, где день введения антитела принят за сутки 0.

Таблица 14

Положение	Сутки, с учетом того, что день введения антитела принят за сутки 0 (● указывает на день проведения)				
	-2	0	1	2	3
Распределение на группы	●				
Введение rhGDF15		●	●	●	●
Введение антитела		●			
Масса тела, прием пищи	●	●	●	●	●
Взятие крови					●

[0143]

Содержание животных

Мышей распределяли в индивидуальные клетки через 3 суток после доставки. Для акклиматизации к индивидуальному содержанию, был выбран период акклиматизации до распределения на группы, составляющий 5 суток.

[0144]

Распределение на группы

Исходя из массы тела, мышей разделяли всего на 6 групп, по 6 животных на группу, с использованием системы получения и обработки экспериментальных данных (SAS institute Japan, R9.3).

[0145]

Введение антитела против hGDF15

rhGDF15, антитело NuMAB2 и антитело MAB17 вводили внутрибрюшинно в количестве 10 мл/кг. В контрольной группе вводили фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS) в количестве 10 мл/кг. Группы представлены в таблице 15.

Таблица 15

	Введение	N
1	DPBS	6

2	rhGDF15 0,3 мг/кг	6
3	rhGDF15 1 мг/кг	6
4	rhGDF15 3 мг/кг	6
5	rhGDF15 3 мг/кг+MAB17 3 мг/кг	6
6	rhGDF15 3 мг/кг+HuMAB2 3 мг/кг	6

[0146]

Измерение массы тела и употребления пищи

Массу тела и употребления пищи определяли в день распределения на группы и через 0, 1, 2 и 3 суток после введения.

[0147]

Взятие крови и анатомия

Взятие крови проводили из нижней полой вены мышей, которых подвергали анестезии посредством ингаляции на 3 сутки после введения антитела. Плазму получали с использованием пробирки для взятия крови EDTA2K и хранили в морозильной камере при -80°C до применения. После взятия крови мышей обескровливали и умерщвляли путем рассечения нижней полой вены под анестезией.

[0148]

Концентрация несвязанного hGDF15 в крови

Для определения hGDF15, который не был связан с антителами в крови (несвязанный hGDF15), комплексы антиген-антитело удаляли по следующей методике. Пять мкл агарозных гранул с белком A/G (Thermo scientific, 20421) смешивали с 50 мкл плазмы мыши и 145 мкл PBS и перемешивали при 4° в течение 2 часов. После центрифугирования супернатант переносили в новую пробирку Ерреп и хранили в морозильной камере при -80°C до применения. Затем проводили измерение GDF15 в крови с использованием набора ELISA для количественного определения GDF15 (R&D systems, DY957) в соответствии с инструкциями набора. Для образцов с концентрацией ниже предела детекции концентрацию GDF15 в крови принимали за 0 пг/мл.

[0149]

Статистический анализ

Критерий суммы рангов Уилкоксона применяли для концентрации несвязанного GDF15 в крови. Для статистического анализа использовали программное обеспечение SAS (SAS institute Japan, R9.3).

[0150]

2. Результаты

Результаты представлены на фиг.6. Концентрация hGDF15 в крови возрастала в зависимости от дозы rhGDF15, и как MAB17, так и HuMAB2, улавливали GDF15 в крови.

[0151]

В. Снижение концентрации GDF15 в крови в модели на мышях со злокачественной опухолью

1. Тестируемые материалы и способы

Тестируемые вещества

- HuMAB2

- MAB1

- MAB13

Контрольные вещества

- MAB17

- MAB957 (R&D Systems)

- Hu01G06-127 (WO2014/100689)

[0152]

Подготовка тестируемых веществ и контрольных веществ

Все антитела получали в концентрации 1 мг/мл в DPBS и хранили в морозильной камере при -80°C до дня введения.

[0153]

Тест-система

Клетки

- 1) Наименование клеточной линии: MKN45

- 2) Происхождение: рак желудка человека

- 3) Источник: банк клеток JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)

- 4) Условия культивирования: 37°C, 5% CO₂

- a) Культуральная среда: RPMI1640

- i) Источник: life technologies

- b) Сыворотка: эмбриональная телячья сыворотка

- i) Концентрация: 10%

- ii) Источник: Tissue Culture Biology

Животные

- 5) Вид/линия: мышь/BALB-c Slc-nu/nu

- 6) Микробиологическая категория: свободные от особых патогенов (SPF)

- 7) Источник: Japan SLC

- 8) Пол: самки

- 9) Возраст в неделях: 7 недель (в момент трансплантации клеток)

- 10) Животных содержали в условиях, описанных в "А. Улавливание hGDF15 в крови".

[0154]

Состав групп

Таблица 16

Тест 1				
	Группа	Трансплантация клеток	Вводимое вещество (доза)	N
1	Нормальные (носитель)	Нет	DPBS	5
2	MKN45 (носитель)	MKN45	DPBS	5
3	MKN45 (MAB17)	MKN45	MAB17 (10 мг/кг)	5
4	MKN45 (MAB957 ¹⁾)	MKN45	MAB957 (10 мг/кг)	5
5	MKN45 (Hu01G06- 127 ²⁾)	MKN45	Hu01G06-127 (10 мг/кг)	5
6	MKN45 (HuMAB2)	MKN45	HuMAB2 (10 мг/кг)	5

1) R&D Systems, MAB957, партия №: UDC1014011

2) Гуманизированное антитело против hGDF15 (WO2014/100689)

Таблица 17

Тест 2				
	Группа	Трансплантация клеток	Вводимое вещество (доза)	N
1	Нормальные (носитель)	Нет	DPBS	5
2	MKN45 (носитель)	MKN45	DPBS	5
3	MKN45 (MAB17)	MKN45	MAB17 (10 мг/кг)	5
4	MKN45 (MAB1)	MKN45	MAB1 (10 мг/кг)	5
5	MKN45 (MAB13)	MKN45	MAB13 (10 мг/кг)	5

[0155]

Способы тестирования

Содержание животных

Мышей распределяли в индивидуальные клетки через 3 суток после доставки. Для акклиматизации к индивидуальному содержанию период акклиматизации до трансплантации MKN45 составил 5 суток.

[0156]

Получение клеток и трансплантация клеток животным

Клетки MKN45 культивировали в 150-мм чашке Петри. Клетки собирали путем обработки 0,25% трипсином-EDTA (SIGMA, T6689) в день трансплантации и супернатант удаляли посредством центрифугирования (1200 об/мин, 5 минут). Клетки суспендировали в DPBS до 5×10^6 клеток/мл и трансплантировали подкожно в брюшную полость мышей, подвергнутых анестезии посредством ингаляции изофлурана, в количестве 0,2 мл/животное (1×10^6 клеток/животное).

[0157]

Распределение на группы

В тесте 1 5 мышей случайным образом отбирали из 42 мышей перед трансплантацией MKN45 в качестве нормальной группы (носитель), и остальным 37 мышам трансплантировали MKN45. Через двенадцать суток после трансплантации MKN45 мышей распределяли на 6 групп, по 5 мышей на группы, с использованием программного обеспечения SAS (SAS institute Japan, R9.4), исходя из массы тела, и в группу MKN45 (носителя), группу MKN45 (MAB17), группу MKN45 (MAB957), группу MKN45 (Hu01G06-127) и группу MKN45 (HuMAB2). Аналогично, в тесте 2 мышей распределяли в нормальную группу (носитель), группу MKN45 (носитель), группу MKN45 (MAB17), группу MKN45 (MAB1) и группу MKN45 (MAB13) в количестве 5 мышей на группу. После распределения на группы лишних животных обескровливали и умерщвляли под анестезией изофлураном.

[0158]

Введение DPBS и антител

DPBS и антитела (10 мл/кг) вводили внутрибрюшинно через 14 суток после трансплантации MKN45 (через 2 суток после распределения на группы). В тесте 1 также вводили DPBS и антитела через 7 суток после начала введения антитела.

[0159]

Взятие образцов крови

Взятие крови проводили из внутренней полую вены мышей, подвергнутых анестезии посредством ингаляции изофлураном через 14 суток (тест 1) или 7 суток (тест 2) после начала введения антитела. Плазму получали с использованием пробирки для взятия крови с EDTA2K и хранили в морозильной камере, установленной на -80°C , до применения. После взятия крови мышей обескровливали и умерщвляли посредством рассечения нижней полую вены под анестезией.

[0160]

Концентрация несвязанного hGDF15 в крови

Для определения hGDF15, который не был связан с антителами в крови

(несвязанный hGDF15), комплексы антиген-антитело удаляли по следующей методике. Пять мкл агарозных гранул с белком A/G (Thermo scientific, 20421) смешивали с 50 мкл плазмы мыши и 145 мкл PBS и перемешивали при 4° в течение 2 часов. После центрифугирования, супернатант переносили в новую пробирку Еррен и хранили в морозильной камере при -80°C до применения. Затем проводили измерение GDF15 в крови с использованием набора ELISA для количественного определения GDF15 (R&D systems, DY957) в соответствии с инструкциями набора. Для образцов с концентрацией ниже предела детекции концентрацию GDF15 в крови принимали за 0 пг/мл.

[0161]

Статистический анализ

Критерий суммы рангов Уилкоксона применяли для концентрации несвязанного GDF15 в крови через 14 суток (тест 1) или 7 суток (тест 2) после начала введения антитела. Для статистического анализа использовали программное обеспечение SAS (SAS institute Japan, R9.4).

[0162]

2. Результаты

В тесте 1 концентрация hGDF15 в крови составляла приблизительно 2000 пг/мл в группе MKN45, в которой трансплантировали клетки MKN45. Среди групп, в которой вводили любые из антител модельным мышам с трансплантированными MKN45, концентрация hGDF15 в крови возрастала в группах введения MAB17, MAB957 и Hu01G06-127 по сравнению с группой введения растворителя. С другой стороны, в группе введения HuMAB2 концентрация hGDF15 в крови снижалась (фиг.7).

[0163]

В таблице 18 представлены относительные величины, когда концентрация hGDF15 в крови в группе введения растворителя была принята за 100 в тесте 2. Аналогично HuMAB2, MAB1 и MAB13 также продемонстрировали снижение концентрации hGDF15 в крови.

Таблица 18

Группа	Относительная величина уровня GDF15 в крови
MKN45 (носитель)	100
MKN45 (MAB17)	302,6
MKN45 (MAB1)	72,1
MKN45 (MAB13)	85,8

[0164]

Приведенные выше результаты отличались от результатов MAB17 в тесте, в котором проводилось введение рекомбинантного hGDF15 (фиг.6). Одной из причин для этого может быть отличие эпитопов между HuMAB2 и другими тремя антителами, использованными в тесте. hGDF15 продуцировался путем расщепления про-hGDF15

протеолитическим ферментом (A.R.Bauson et al. Cancer Res. 2005; 65 (6): 2320-2336). Считается, что NuMAB2 имеет эпитоп вблизи этого участка расщепления и связывание с этим эпитопом может подавлять продуцирование hGDF15. Было описано, что нейтрализующее антитело против CCL-2 (ABN912) не улучшало, а ухудшало состояние пациентов с ревматоидным артритом. Антитело повышало концентрацию CCL-2 в крови дозозависимым образом, и это считалось одной из причин этого обострения, что указывает на важность снижения уровней антигена в крови (J.J.Haringman et al. Arthritis & Rheumatism 2006; 54 (8): 2387-2392). Таким образом, ожидается, что антитела против GDF15, которые снижают уровень GDF15 в крови, такие как NuMAB2, будут клинически более полезными, чем антитела, которые повышают уровень hGDF15 в крови.

[0165]

С. Улучшение симптомов кахексии в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль (1)

1. Тестируемые материалы и способы

1.1 Получение тестируемого вещества

NuMAB2 получали в дозе 1 мг/мл с DPBS и хранили в морозильной камере при -80°C до дня введения.

[0166]

1.2 Тест-система

1.2.1 Клетки

1) Наименование клеточной линии: MKN45

2) Происхождение: рак желудка человека

3) Источник: банк клеток JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)

4) Условия культивирования: 37°C, 5% CO₂

а) Культуральная среда: RPMI 1640

і) Источник: life technologies

б) Сыворотка: эмбриональная телячья сыворотка

і) Концентрация: 10%

іі) Источник: Tissue Culture Biology

1.2.2 Животные

1) Вид/линия: мышь/BALB-c Slc-nu/nu

2) Микробиологическая категория: свободные от особых патогенов (SPF)

3) Источник: Japan SLC

4) Пол: самки

5) Возраст в неделях: 7 недель (на момент трансплантации клеток)

6) Условия содержания

Животных содержания в следующих условиях:

а) Температура: 23 ± 2°C

б) Влажность: 60 ± 10%

с) Освещение: время освещения: с 7:00 до 19:00

время без освещения: с 19:00 до 7:00

d) пища и вода: свободный прием, CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.), водопроводная вода

[0167]

1.2.3 Состав групп

Таблица 19

	Группа	Трансплантация клеток	Вводимое вещество (доза)	N
1	Нормальные (носитель)	Нет	DPBS	8
2	MKN45 (носитель)	MKN45	DPBS	8
3	MKN45 (HuMAB2)	MKN45	HuMAB2 (10 мг/кг)	8

[0168]

1.3 Способы тестирования

1.3.1 Схема тестирования

В таблице 20 представлена схема тестирования, где день введения антитела был принят за сутки 0.

Таблица 20

Положение	Сутки, с учетом того, день введения антитела принят за сутки 0 (● указывает на день проведения)								
	-14	-11	-8	-5	-2	0	2	4	7
Трансплантация MKN45	●								
Распределение на группы					●				
Введение антитела					●				
Масса тела, прием пищи	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Взятие крови, секция									●

[0169]

1.3.2 Содержание животных

Мышей распределяли в индивидуальные клетки через 3 суток после доставки. Для акклиматизации к индивидуальному содержанию период акклиматизации до трансплантации MKN45 составил 5 суток.

[0170]

1.3.3 Получение клеток и трансплантация клеток животным

Клетки MKN45 культивировали в 150-мм чашке Петри. Клетки собирали путем обработки 0,25% трипсином-EDTA (SIGMA, T6689) в день трансплантации и супернатант удаляли посредством центрифугирования (1200 об/мин, 5 минут). Клетки суспендировали в DPBS до 5×10^6 клеток/мл и трансплантировали подкожно в брюшную полость мышей, подвергнутых анестезии посредством ингаляции изофлурана, в количестве 0,2 мл/животное (1×10^6 клеток/животное).

[0171]

1.3.4 Распределение на группы

Перед трансплантацией MKN45, 8 мышей отбирали случайным образом из 32 мышей в качестве нормальной группы и остальным 24 мышам трансплантировали MKN45. Через двенадцать суток после трансплантации MKN45 мышей разделяли всего на 2 группы, по 8 мышей на группу, исходя из массы тела, с использованием системы сбора и обработки экспериментальных данных (EDCS, ver. 2.1): группу MKN45 и группу HuMAB2. После распределения на группы лишних животных обескровливали и умерщвляли под анестезией изофлураном.

[0172]

1.3.5 Введение DPBS и HuMAB2

DPBS и HuMAB2 вводили через 14 суток после трансплантации MKN45 (через 2 суток после распределения на группы). DPBS и HuMAB2 вводили внутрибрюшинно в количестве 10 мл/кг.

[0173]

1.3.6 Измерение массы тела и употребления пищи

Массу тела и употребления пищи определяли каждые 3 суток со дня трансплантации до дня введения антитела. Измерение проводили через 0, 2, 4 и 7 суток после введения антитела.

[0174]

1.3.7 Взятие крови и анатомия

Взятие крови проводили из нижней полой вены мышей, которых подвергали анестезии посредством ингаляции изофлурана на 3 сутки после введения антитела. Плазму получали с использованием пробирки для взятия крови EDTA2K и хранили в морозильной камере при -80°C до применения. После взятия крови мышей обескровливали и умерщвляли путем рассечения нижней полой вены под анестезией. Опухоль извлекали путем рассечения кожи участка опухоли хирургическими ножницами и извлеченную опухоль взвешивали.

[0175]

1.4 Статистический анализ

Что касается массы тела и массы опухоли через 7 суток после введения антитела и совокупного употребления пищи со дня введения антитела до 7 дня, проводили тест с

использованием непарного t-критерия между нормальной группой и группой MKN45 и между группой MKN45 и группой HuMAB2, соответственно. Для концентрации несвязанного GDF15 в крови использовали критерий суммы рангов Уилкоксона. Для статистического анализа использовали программное обеспечение SAS (SAS institute Japan, R9.3).

[0176]

2. Результаты

С использованием мышей, имеющих злокачественную опухоль (которым трансплантированы MKN45), исследовали эффект HuMAB2 на изменения массы тела и употребления пищи, которые являются симптомами кахексии при злокачественной опухоли, а также исследовали эффект на количество несвязанного GDF15 в крови. На фиг.8 представлено изменение массы тела, совокупное употребление пищи в течение 7 суток после введения антитела и концентрация несвязанного GDF15 через 7 суток после введения антитела. Масса тела через 7 суток после введения антитела была снижена приблизительно на 4 г в группе MKN45 по сравнению с нормальной группой, и значительное снижение массы тела наблюдали после трансплантации клеток MKN45 ($P < 0,01$). С другой стороны, в группе HuMAB2 после введения антитела наблюдалось восстановление после снижения массы тела, и наблюдали значимое увеличение массы тела по сравнению с группой MKN45 ($P < 0,01$). Аналогично, совокупное употребление пищи в течение 7 суток после введения антитела было значимо снижено в группе MKN45 ($P < 0,01$), и значимо повышено в группе HuMAB2 по сравнению с группой MKN45 ($P < 0,01$). Не было обнаружено несвязанного GDF15 в крови в нормальной группе, однако концентрация несвязанного GDF15 в крови значимо возрастала до приблизительно 1500 пг/мл в группе MKN45 ($P < 0,01$), и, аналогично результату на фиг.7, она значимо снижалась до приблизительно одной двенадцатой в группе HuMAB2 ($P < 0,01$). Эти результаты подтвердили, что подобные кахексии симптомы (снижение массы тела, употребление пищи) у мышей с трансплантированными MKN45 восстанавливались после введения HuMAB2.

[0177]

D. Улучшение симптомов кахексии в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль (2)

1. Тестируемые материалы и способы

1.1 Получение тестируемого вещества

HuMAB2 получали в концентрации 1 мг/мл с DPBS и хранили в морозильной камере при -80°C до дня введения.

[0178]

1.2 Тест-система

1.2.1 Клетки

1) Наименование клеточной линии: MKN45

2) Происхождение: человек (ткань рака желудка человека)

3) Источник: JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)

4) Условия культивирования: 37°C, 5% CO₂, условия предварительного культивирования: 37°C, 5% CO₂

a) Культуральная среда: RPMI 1640

i) Источник: life technologies

b) Сыворотка: эмбриональная телячья сыворотка

i) Концентрация: 10%

ii) Источник: Tissue Culture Biology

1.2.2 Животные

1) Вид/линия: мышь/BALB-c Slc-nu/nu

2) Микробиологическая категория: свободные от особых патогенов (SPF)

3) Источник: Japan SLC

4) Пол: самки

5) Возраст в неделях: 6-12 недель

6) Условия содержания

Животных содержания в следующих условиях:

a) Температура: 23 ± 2°C

b) Влажность: 60 ± 10%

c) Освещение: время освещения: с 7:00 до 19:00

время без освещения: с 19:00 до 7:00

d) пища и вода: свободный прием (группу парного кормления в тесте 1 кормили назначенным количеством каждые сутки), CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.), водопроводная вода

[0179]

1.2.3 Состав групп

Таблица 21

	Группа	Трансплантация клеток	Вводимое вещество (доза)	N
1	Нормальные (носитель)	Нет	DPBS	8
2	MKN45 (носитель)	MKN45	DPBS	8
3	MKN45 (HuMAB2)	MKN45	HuMAB2 (10 мг/кг)	8

[0180]

1.3 Способы введения

1.3.1 Подготовка модели, распределение на группы и введение антитела

Сначала 5 животных случайным образом отбирали в качестве нормальной группы. Модель кахексии подготавливали, как для нормальной группы. Модель кахексии

подготавливали, как описано в С выше, и антитело вводили внутривентриально (фиг.9).

[0181]

1.3.2 Измерение двигательной активности

Для измерения двигательной активности в клетку устанавливали беспроводное беговое колесо (Brain Science Idea, ENV-044), и число вращений колеса для бега определяли в качестве двигательной активности. Измеренные величины получали каждые 12 часов светового периода (с 7:00 по 19:00) и периода темноты (с 19:00 по 7:00).

[0182]

1.4 Конечный результат

- Масса тела

- Двигательная активность

[0183]

1.5 Статистический анализ

Распределение на группы проводили по одному показателю с использованием в качестве показателя массы. Для распределения на группы и тестирования использовали программное обеспечение SAS (SAS institute Japan, R9.3).

[0184]

2. Результаты

Для оценки подобных кахексии симптомов, индуцированных GDF15, в клетку устанавливали беговое колесо и определяли двигательную активность. На фиг.9 представлена схема тестирования. По сравнению с нормальной группой, величина активности в группе MKN45 снижалась до приблизительно 1/10. Было продемонстрировано, что это снижение величины активности восстанавливалось практически до того же уровня, что и в нормальной группе, приблизительно через 3 суток после введения NuMAB2. Также было продемонстрировано, что в группе MKN45 наблюдалось не только снижение величины активности, но также и изменение паттерна активности. В нормальной группе наблюдали характеристики ночных животных, которые становятся активными в темный период и менее активный в светлый период. Однако в группе MKN45 паттерн активности был очевидно обратным. Затем в группе NuMAB2, в которой вводили антитела, паттерн восстанавливался, как в нормальной группе.

[0185]

III. Производство антител (2)

A. Секвенирование

Аминокислотные последовательности MAB1 и MAB13 (таблица 1) определяли аналогично тому, как для MAB2. Аминокислотные последовательности переменных областей Н- и L-цепи представлены в таблице 22, и последовательности CDR представлены в таблице 23.

[0186]

Таблица 22

Наименование антитела	Наименование последовательности (наименование вектора)	Аминокислотная последовательность (Последовательность CDR подчеркнута)	SEQ ID NO:
MAB1	Вариабельная область Н-цепи	MSSPQSLKTLTITMGWTWIFILILSVTTGVH SEVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYST <u>GYNMN</u> WVKQSNQKSLEWIG <u>NIDPYYGGTSYN</u> <u>QKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSA VYYCAR <u>PGRYDGAWFAY</u> WGQGLTVTVSA	133
	Вариабельная область L-цепи	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPA ILSASPGEKVTMT <u>CRASSNVNYMH</u> WYQOKPG SSPKPWIY <u>ATSNLAS</u> GVPARFSGSGSGTSYS LTISRVEAEDAATYYC <u>QQWSDNPLT</u> FGAGTK LELK	134
MAB13	Вариабельная область Н-цепи	MSSPQSLKTLTITMGGIWIFLFLSGTAGVH SEIQLQQTGPPELVKPGASVKISCKASGYST <u>DYIML</u> WVKQRHGKSLEWIG <u>NIHPYYGTTSYN</u> <u>LKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSA VYYCARG <u>GIGGSPFAY</u> WGQGLTVTVSA	135
	Вариабельная область L-цепи	MKLPVRLVLVLMFWIPASSSDVLMQTPTPLSLP VSLGDAQASISCR <u>SSQSIVHSNGNTYLE</u> WYLQ KPGQSPKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVDPDRFTGTGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYC <u>FQGSHPVPT</u> FGG GTKLEIK	136

[0187]

Таблица 23

Наименование антитела	Цепь	Номер CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
MAB1	H	CDR-H1	GYNMN	137
	H	CDR-H2	NIDPYYGGTSYNQKFKG	138
	H	CDR-H3	PGRYDGAWFAY	139
	L	CDR-L1	RASSNVNYMH	140
	L	CDR-L2	ATSNLAS	141
	L	CDR-L3	QQWSDNPLT	142
MAB13	H	CDR-H1	DYIML	143
	H	CDR-H2	NIHPYYGTTSYNLKFKG	144
	H	CDR-H3	GIGGSPFAY	145
	L	CDR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE	146
	L	CDR-L2	KVSNRFS	147
	L	CDR-L3	FQGSHPVPT	148

[0188]

В. Получение вариантов антител

Аналогично тому, как в "I. Производство антител (1) G. Связывание с hGDF15 варианта HuMAB2, полученного посредством аминокислотной замены в CDR", дополнительно получали варианты HuMAB2, представленные в таблице 24. На фиг.10 представлена величина связывания с hGDF15 каждого варианта антитела, когда величину

связывания HuMAB2 принимали за 100. Получали антитела, демонстрирующие величину связывания, равную или превышающую величину связывания HuMAB2.

Таблица 24

Наименование антитела	Наименование последовательности		Участок мутации		Последовательность	SEQ ID NO:
	Н-цепь	Л-цепь	Цепь	Область		
H54T-L7	H54T	L7	H	CDR-H1	SDCYWT	149
H54N-L7	H54N	L7	H	CDR-H1	SDCYWN	150
H71R-L7	H71R	L7	H	CDR-H2	YTRYSGITYYNPSLAS	151
H71H-L7	H71H	L7	H	CDR-H2	YTHYSGITYYNPSLAS	152
H771-L7	H771	L7	H	CDR-H2	YTIYSGITYYNPSLAS	153
H3-L51Y	H3	L51Y	L	CDR-L1	RASQDISYYLN	154
H3-L72F	H3	L72F	L	CDR-L2	YTF T LHS	155
H3-L73Q	H3	L73Q	L	CDR-L2	YTS Q LHS	156
H3-L74H	H3	L74H	L	CDR-L2	YTST H HS	157

[0189]

Кроме того, Н-цепь (H49R, H49D, H48S, H71Y, H83R или H120F) и Л-цепь (L48K, L112D, L72F или L74H) (таблица 25), которые происходили из вариантов HuMAB2, имеющих высокую активность связывания с hGDF15, объединяли и исследовали связывание антитела, полученного таким образом, с hGDF15. Результаты представлены на фиг.11. Было получено большое количество антител, демонстрирующих величину связывания, равную или превышающую величину связывания HuMAB2.

Таблица 25

Наименование антитела	Участок мутации		Последовательность	SEQ ID NO:
	Цепь	Область		
H49R	H	CDR-H1	R DCYWI	38
H49D	H	CDR-H1	D DCYWI	39
H48S	H	FR1	DVQLQESGPGLVKPSSETL SLTCTVSGFSIS	51
H71Y	H	CDR-H2	YTYYSGITYYNPSLAS	52
H83R	H	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSLR S	66
H120F	H	CDR-H3	DCD F AMDY	77
L48K	L	CDR-L1	RASQ K ISNYLN	85
L112D	L	CDR-L3	QQG D TLPWT	95
L72F	L	CDR-L2	YTF T LHS	155
L74H	L	CDR-L2	YTST H HS	157

[0190]

С. Оценка ингибиторной активности в отношении образования комплекса GDF15, GFRAL и RET

GDF15 образует комплекс с рецептором GFRAL и корецептором RET для передачи внутриклеточных сигналов. Следовательно, исследовали эффекты HuMAB2 в отношении образования комплекса GDF15, GFRAL и RET.

[0191]

Сначала исследовали эффект на образование комплекса GDF15 и GFRAL (фиг.12). GFRAL (R&D systems, 9697-GR) иммобилизовывали на планшете и GDF15 (R&D systems, 957-GD/CF), биотинилированный посредством набора EZ-Link Micro NHS-PEG4-Biotinylation Kit (Thermo Fisher Scientific, 21955) и подвергнутого серийному разведению раствора моноклонального антитела против GDF15 (таблица 26), подвергали реакции с планшетом. В качестве отрицательного контрольного антитела использовали IgG1 человека, изотипический контроль каппа (Abcam). Детекцию GDF15, связанного с GFRAL, проводили с использованием Pierce High Sensitivity Streptavidin -HRP (Thermo Fisher Scientific, 21130). Для развития окраски использовали субстрат пероксидазы TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue (SeraCare Life Sciences) и реакцию останавливали добавлением стоп-раствора (Wako). Поглощение измеряли при 450 нм (OD450) с использованием Emax (Molecular Devices). % от контрольной величины вычисляли в соответствии с уравнением 1 из величины OD450 при добавлении каждого антитела с величиной OD450 без добавления антитела в качестве контроля. Величину IC50 получали путем вычисления уровня ингибирования из % контрольной величины, полученной таким образом в соответствии с уравнением 2, и с использованием Excel masgo для вычисления IC50.

$\% \text{ от контроля} = \frac{\text{величина OD450 для образца с добавлением антитела}}{\text{величина OD450 без добавления антитела}} \times 100$ (Уравнение 1)

Уровень ингибирования = $100 - \% \text{ от контроля}$ (уравнение 2)

[0192]

Как показано в таблице 26, антитела против GDF15, отличные от HuMAB2, ингибирование образование комплекса GDF15 и GFRAL, в то время как HuMAB2 не ингибировали его. Полагали, что это отличие было следствием различия эпитопов этих антител.

Таблица 26

Антитело	IC50 (нМ)
HuMAB2	>500
Hu01G06-127 ¹⁾	0,05
MAB17	11,98
MAB957 ²⁾	11,13
IgG человека ³⁾ (отрицательный контроль)	>500

1) Гуманизированное антитело против hGDF15 (WO2014/100689)

2) R&D Systems, MAB957, партия №: UDC1014011

3) IgG1 человека, изотипический контроль каппа (Abcam)

[0193]

Затем исследовали эффекты на образование комплекса GDF15, GFRAL и RET. В

планшет для ELISA, на котором был иммобилизован 30 нМ GFRAL (R&D systems) добавляли смесь 50 нМ GDF15 (R&D Systems, 9279-GD), 30 нМ RET (R&D Systems, 1168-CR) и серийно разбавленного раствора NuMAB2 (0-500 нМ). В качестве отрицательного контрольного антитела добавляли IgG1 человека, изотипический контроль каппа (Abcam). Детекцию комплекса GDF15/GFRAL/RET, образовавшегося таким образом, проводили с использованием конъюгированного с пероксидазой антитела против His (R&D systems, MAB050H). Для развития окраски использовали субстрат пероксидазы TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue (SeraCare Life Sciences) и реакцию останавливали добавлением стоп-раствора (Wako). Поглощение измеряли при 450 нм (OD450) с использованием Emax (Molecular Devices). % от контрольной величины вычисляли в соответствии с уравнением 1 из величины OD450 при добавлении каждого антитела с величиной OD450 без добавления антитела (0 нМ антитела) в качестве контроля. Величину IC50 получали путем вычисления уровня ингибирования из % контрольной величины, полученной таким образом в соответствии с уравнением 2, и с использованием Excel macro для вычисления IC50.

[0194]

NuMAB2 не продемонстрировало ингибиторную активность против образования комплекса GDF15/GFRAL (таблица 26), но продемонстрировало ее против образования комплекса GDF15/GFRAL/RET (фиг.13). Из этого результата, считалось, что NuMAB2 демонстрирует его ингибиторную активность на функцию GDF15 путем ингибирования образования комплекса с RET, который функционирует, передавая сигналы в клетки.

[0195]

VI. Фармакологический тест (2)

А. Улучшение симптомов кахексии в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль (3)

Аналогично тому, как в "II. Фармакологический тест (1) С. Улучшение симптомов кахексии в модели на мышах, имеющих злокачественную опухоль (1)", исследовали эффект MAB1 на массу тела, прием пищи и количество несвязанного GDF15 в крови с использованием мышей, имеющих злокачественную опухоль (с трансплантированными клетками MKN45). Группы представлены в таблице 27.

Таблица 27

	Группа	Трансплантация клеток	Вводимое вещество (доза)	N
1	Нормальные (носитель)	Нет	DPBS	8
2	MKN45 (носитель)	MKN45	DPBS	8
3	MKN45 (MAB17)	MKN45	MAB17 (10 мг/кг)	8
	MKN45 (MAB1)	MKN45	MAB1 (10 мг/кг)	8

[0196]

На фиг.14 представлены изменения массы тела, совокупного употребления пищи в течение 7 суток после введения антитела и концентрация несвязанного GDF15 в крови через 7 суток после введения антитела. В группе MKN45 наблюдали снижение массы тела, в то время как в группе MAB1 после введения антитела наблюдали восстановление после снижения массы тела. Совокупное употребление пищи через 7 суток после введения антитела также имело тенденцию к повышению в группе MAB1 по сравнению с группой MKN45. Концентрация несвязанного GDF15, возросшая в результате трансплантации MKN45, снижалась посредством MAB1, также как и HuMAB2 (фиг.8). Эти результаты подтвердили, что подобные кахексии симптомы (снижение массы тела, употребление пищи) у мышей с трансплантированными MKN45, проходят после введения MAB1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против hGDF15, где антитело связывается с эпитопом hGDF15, содержащим аминокислотную последовательность DHCPLGPGRCCRLH (SEQ ID NO: 3).

2. Антитело по п.1, где антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR1, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR2, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR2, содержащейся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащуюся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR3, состоящей из аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности CDR3, содержащейся в вариабельной области легкой цепи,

содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

3. Антитело по п.1 или 2, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

4. Антитело по любому из пп.1-3, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и
вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

5. Антитело по любому из пп.1-4, где антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную

модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

7. Антитело по п.1 или 6, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 141 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

8. Антитело по любому из пп.1, 6 и 7, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, и
вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142.

9. Антитело по любому из пп.1 и 6-8, где антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, и CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в

модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

11. Антитело по п.1 или 10, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков; и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 148 наличием модификации от одного до трех аминокислотных остатков.

12. Антитело по любому из пп.1, 10 и 11, где антитело содержит
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, и
вариабельную область легкой цепи, которая содержит

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

13. Антитело по любому из пп.1 и 10-12, где антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, и CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136.

14. Антитело по любому из пп.1-13, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 90% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 наличием модификации от 1 до 20 аминокислотных остатков;

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую 90% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 наличием модификации от 1 до 20 аминокислотных остатков.

15. Антитело по любому из пп.1-14, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

16. Антитело против hGDF15, где антитело конкурирует за связывание hGDF15 с антителом по любому из пп.1-15.

17. Антитело по п.16, где антитело конкурирует за связывание hGDF15 с антителом против hGDF15, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

18. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-17.

19. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.18.

20. Трансформированная клетка, содержащая полинуклеотид по п.18.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-17.

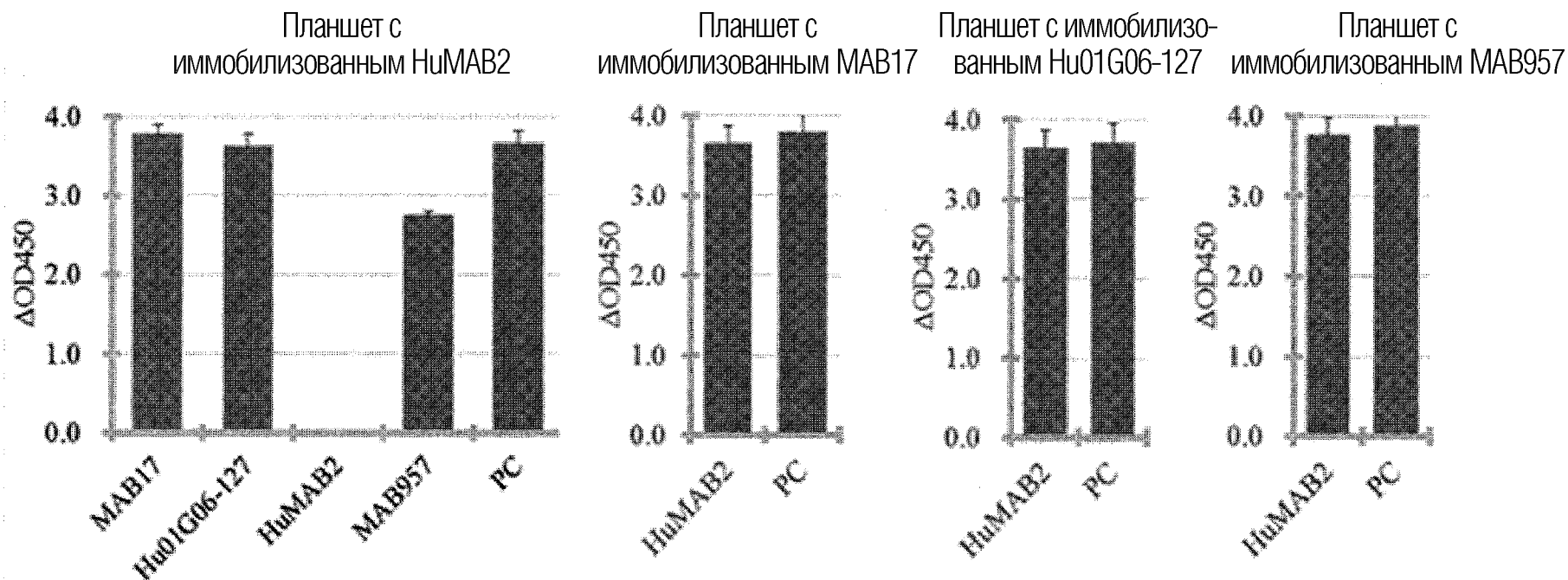
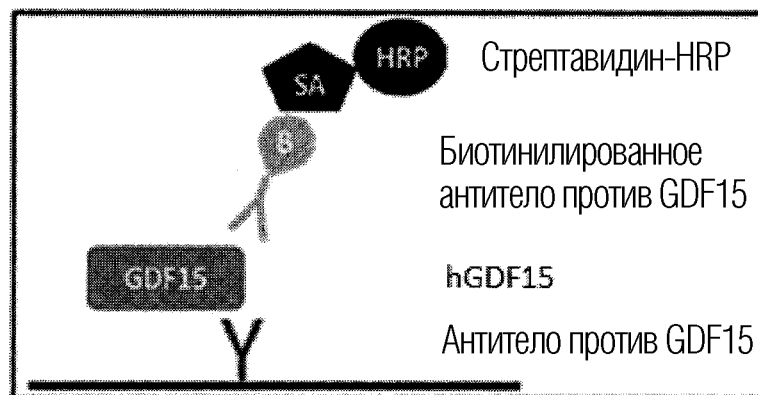
22. Фармацевтическая композиция по п.21, где фармацевтическая композиция предназначена для лечения заболевания или симптома, ассоциированных с GDF15.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, где заболевание или симптом, ассоциированные с GDF15, представляют собой злокачественную опухоль.

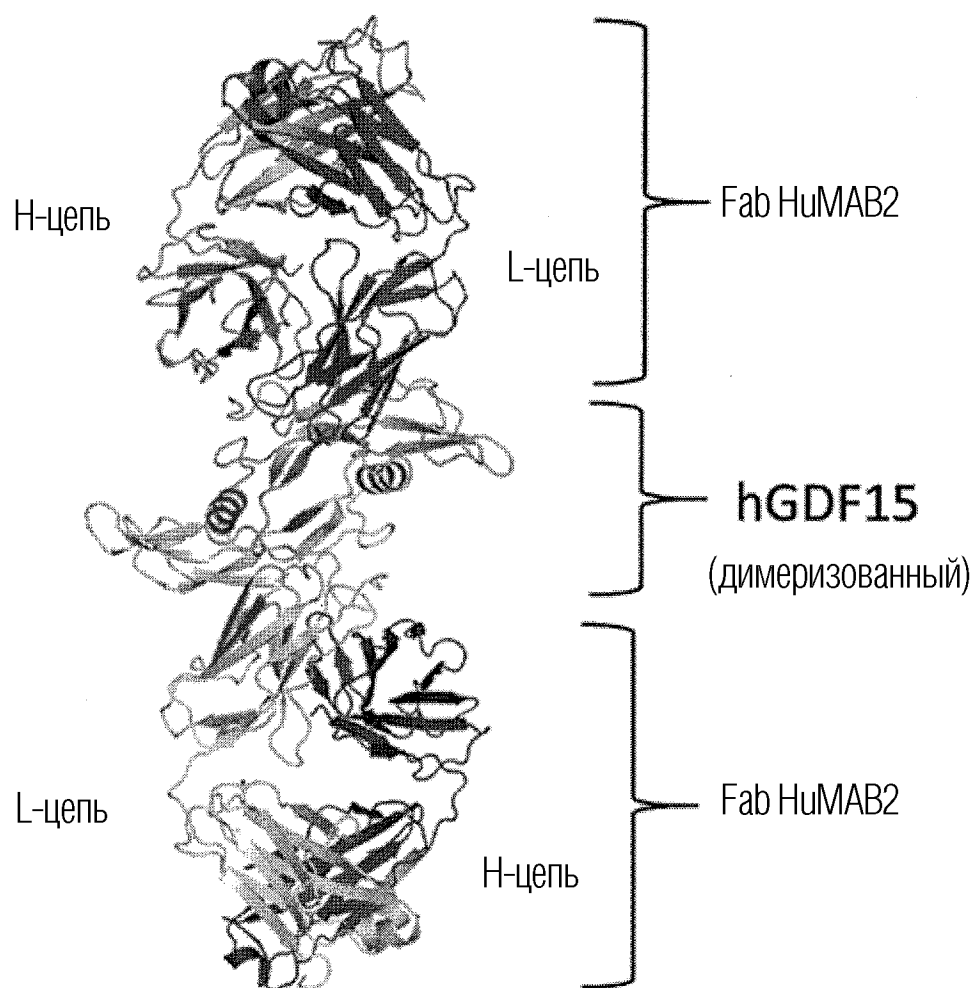
24. Фармацевтическая композиция по п.22, где заболевание или симптом, ассоциированные с GDF15, представляют собой кахексию.

25. Фармацевтическая композиция по п.24, где кахексия представляет собой кахексию злокачественной опухоли.

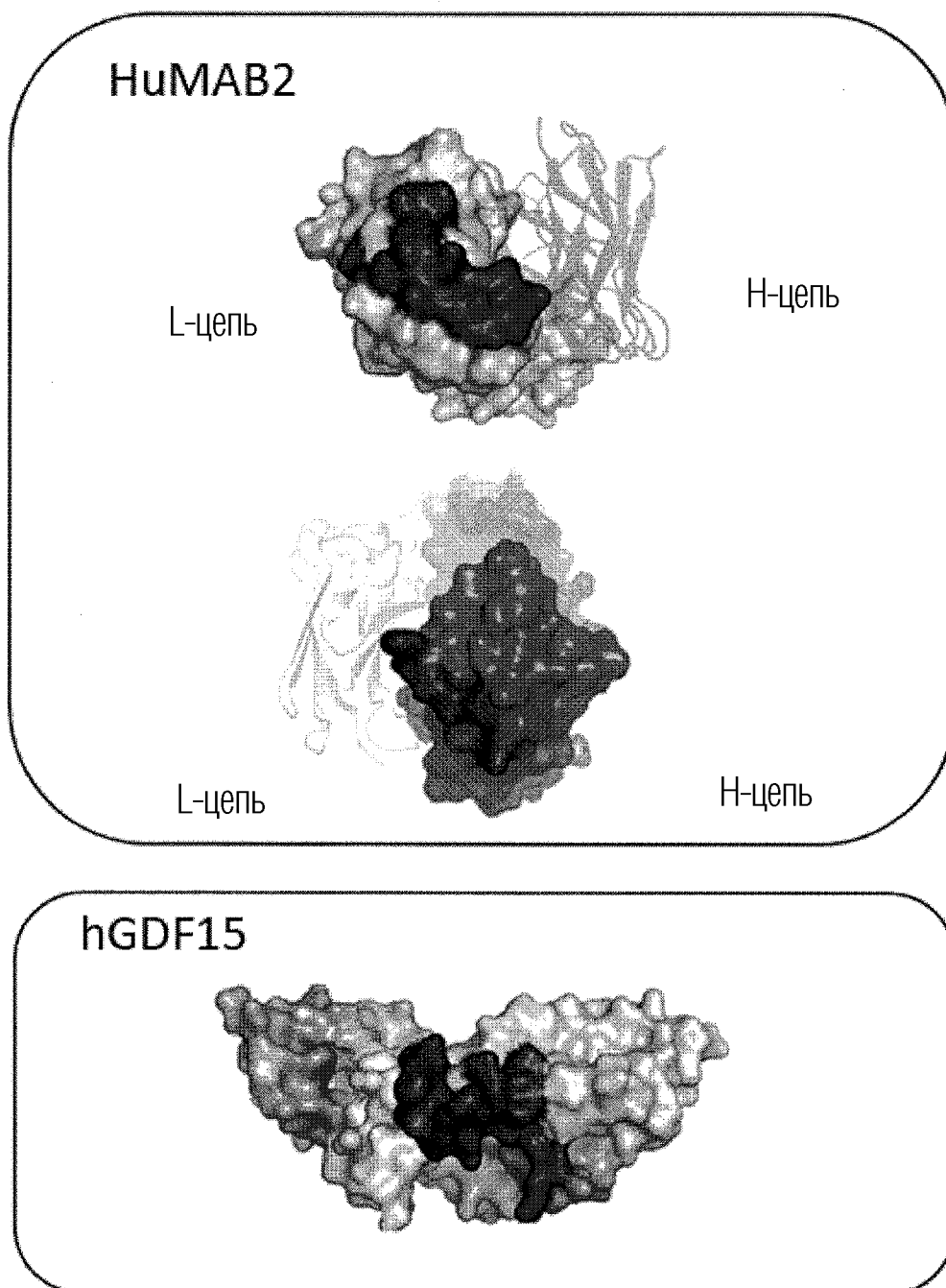
26. Фармацевтическая композиция по п.21, где фармацевтическая композиция предназначена для снижения концентрации GDF15 в крови.



ФИГ. 1



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

```

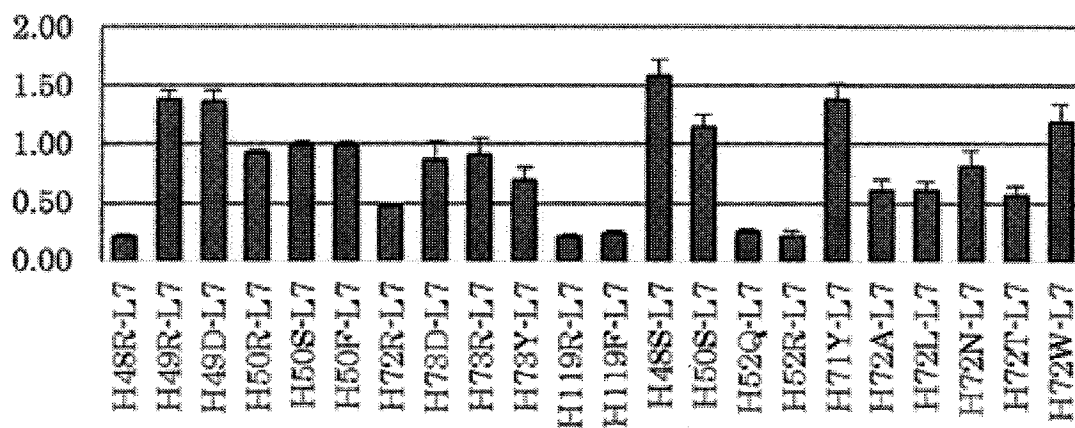
      ↓      10      ↓      ↓      20      30      40
ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ
      50      60      70      ↓      80
VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP
      90      100      110      112
ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLQT YDDLAKDCH CI (SEQ ID NO: 2)

```



Относительная величина связывания

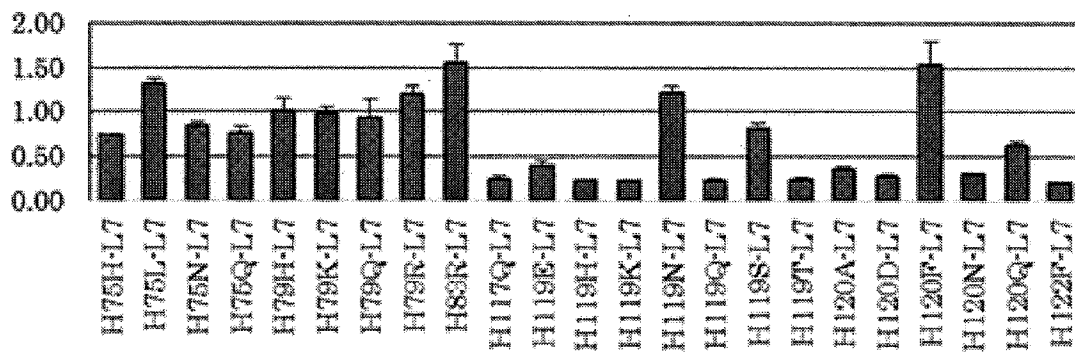
Антитела с модифицированной Н-цепью 1/2



ФИГ. 5А

Относительная величина связывания

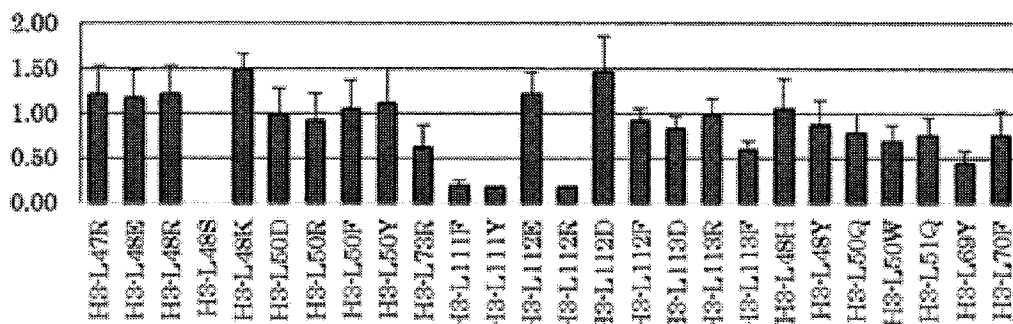
Антитела с модифицированной Н-цепью 2/2



ФИГ. 5В

Относительная величина связывания

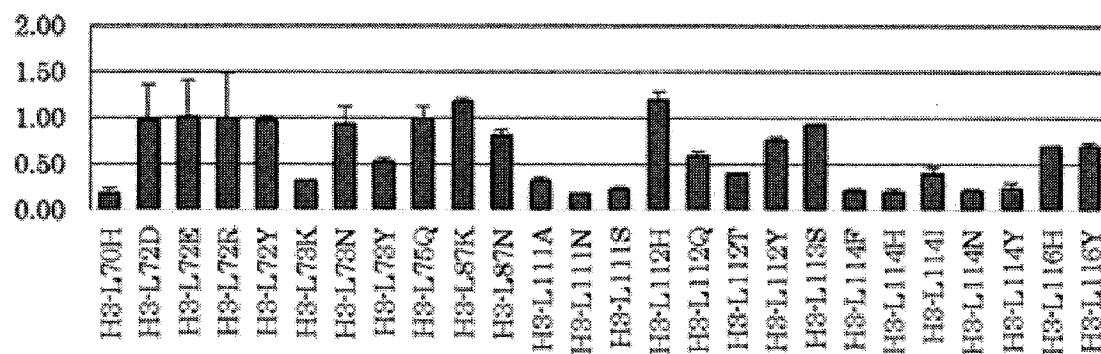
Антитела с модифицированной L-цепью 1/2



ФИГ. 5C

Относительная величина связывания

Антитела с модифицированной L-цепью 2/2



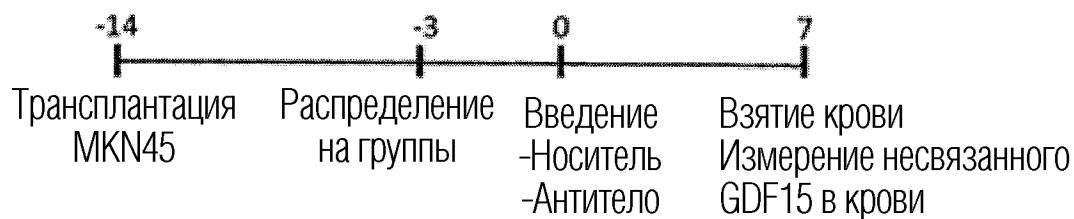
ФИГ. 5D

Группа	Лечение
1	Носитель
2	rhGDF15 0.3мг/кг
3	rhGDF15 1мг/кг
4	rhGDF15 3мг/кг
5	rhGDF15 3мг/кг + MAB17 3мг/кг
6	rhGDF15 3мг/кг + HuMAB2 3мг/кг

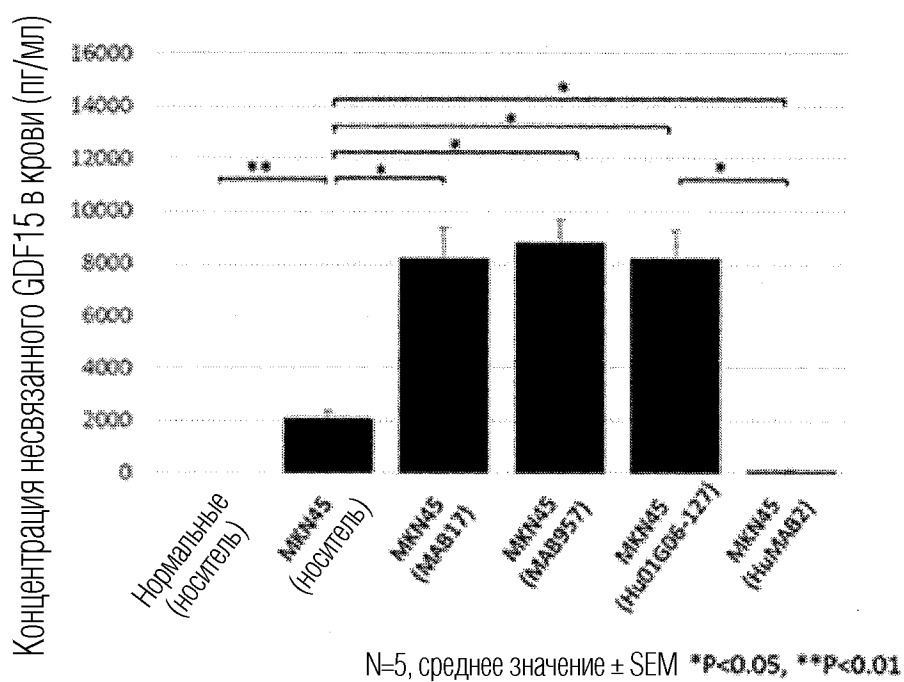


ФИГ. 6

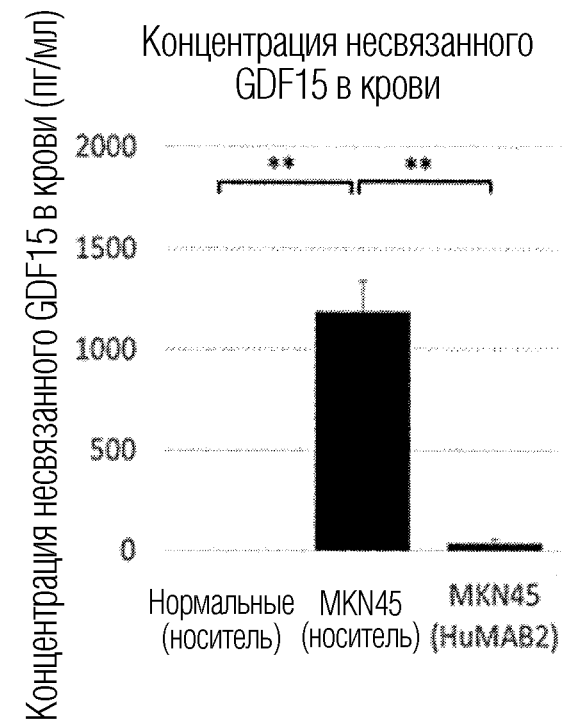
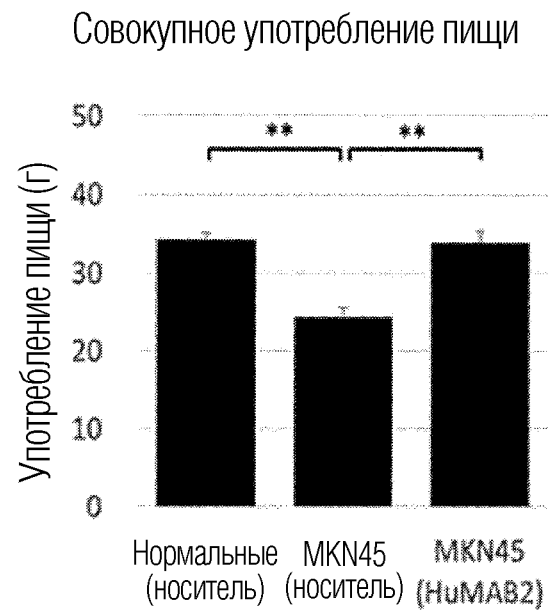
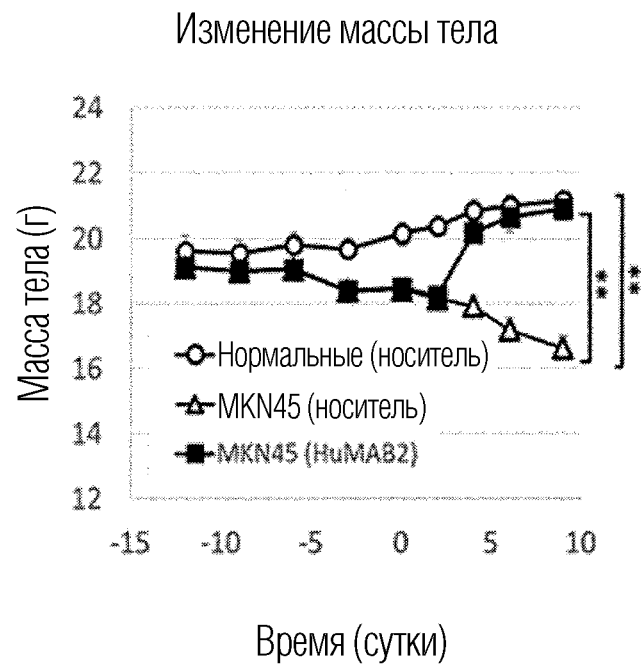
Схема тестирования



Несвязанный GDF15 в крови



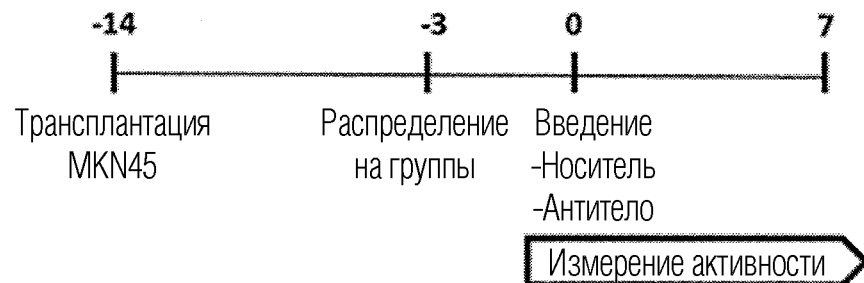
ФИГ. 7



N=8, среднее значение $\pm$ SEM **P<0.01

ФИГ. 8

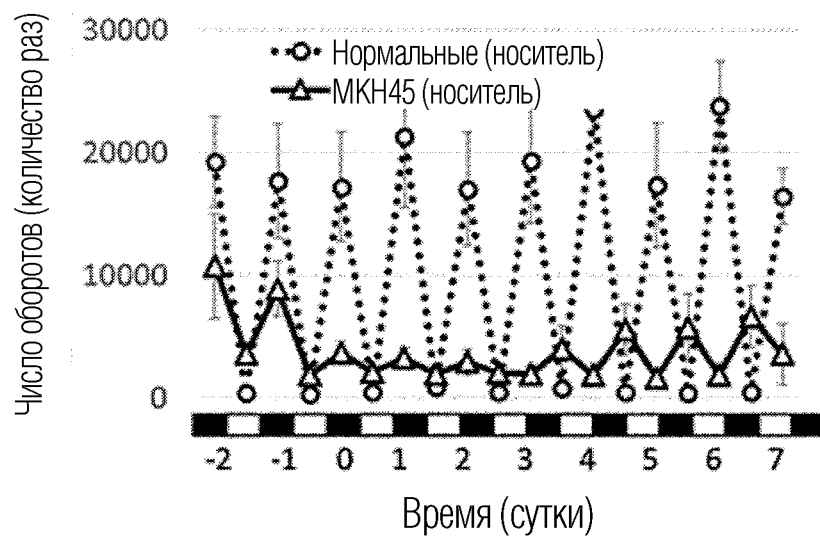
Схема тестирования



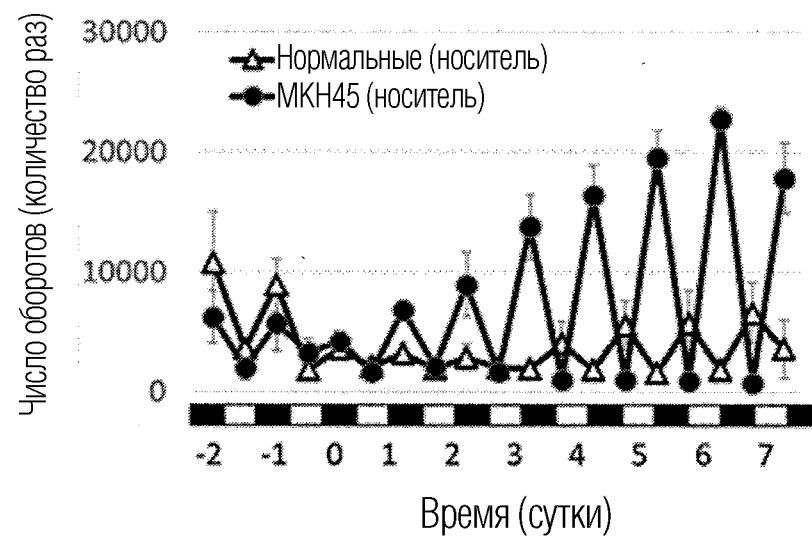
среднее значение $\pm$ SEM, N=4-5

□; 07:00-19:00 ■; 19:00-07:00

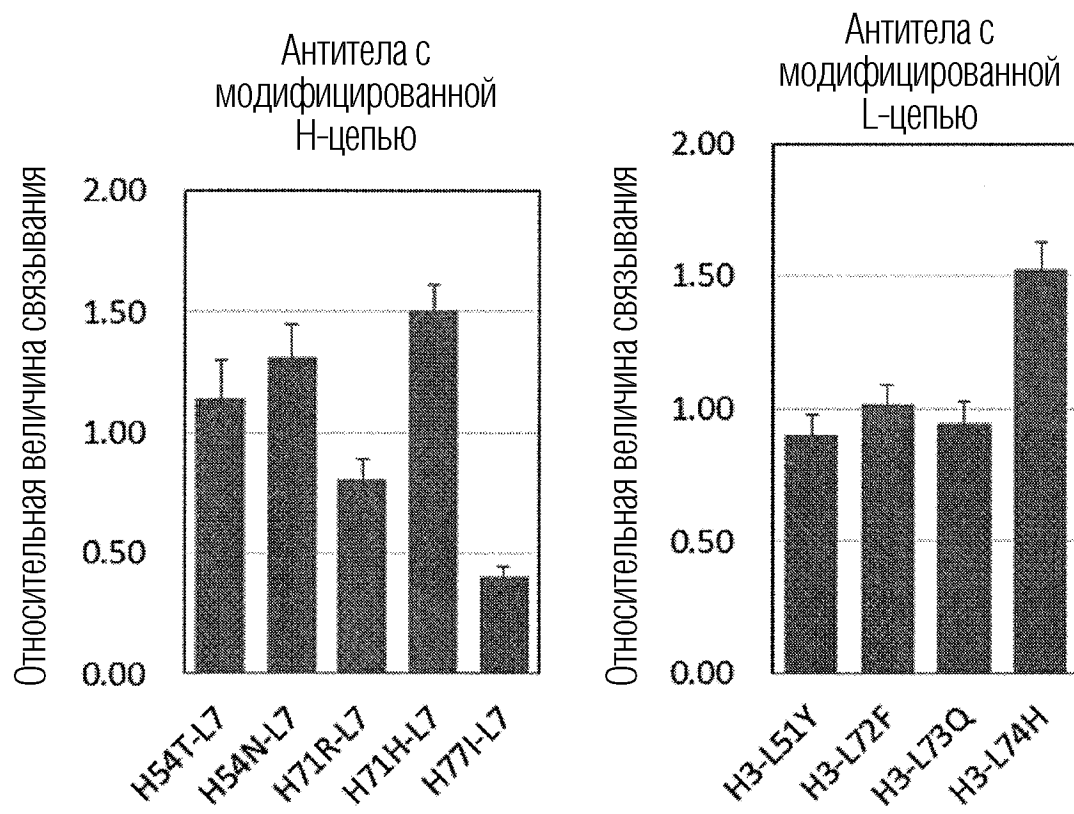
Нормальная группа и группа MKN45 (носитель)



Группа MKN45 (носитель) и группа MKN45 (HuMAB2)

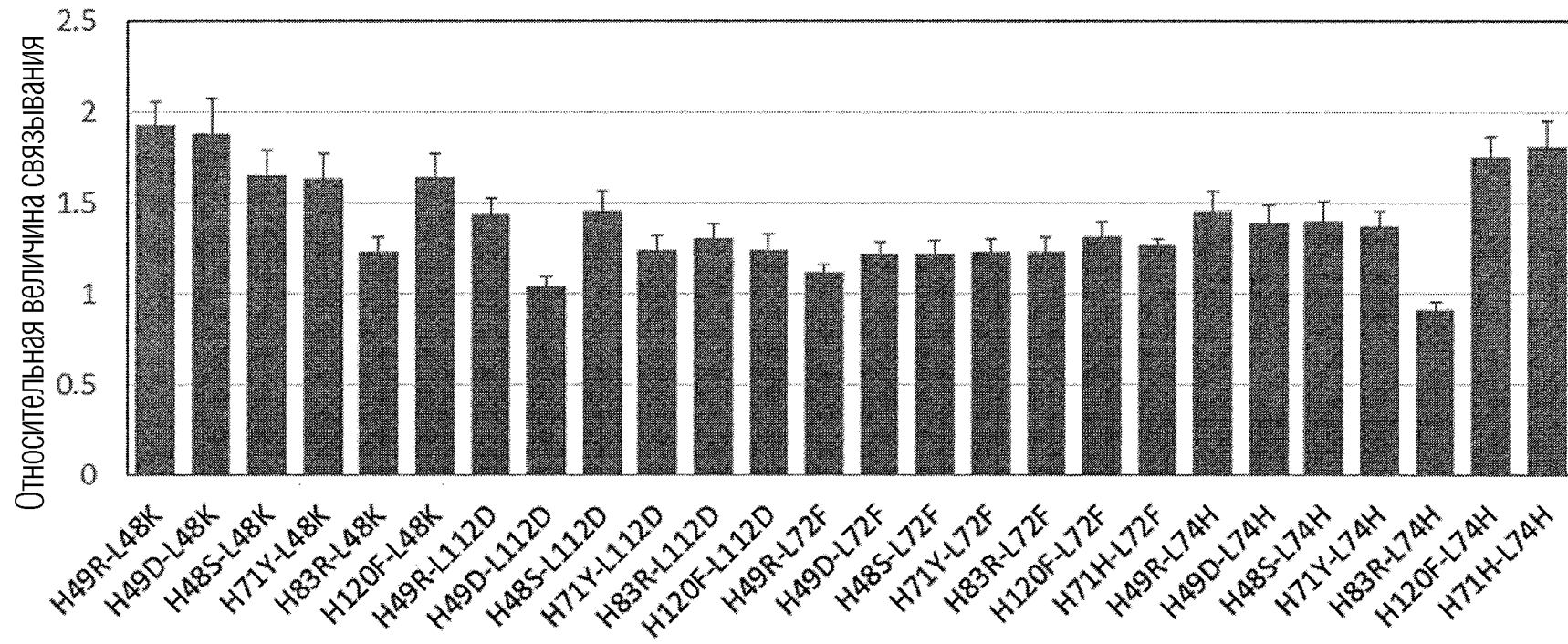


ФИГ. 9

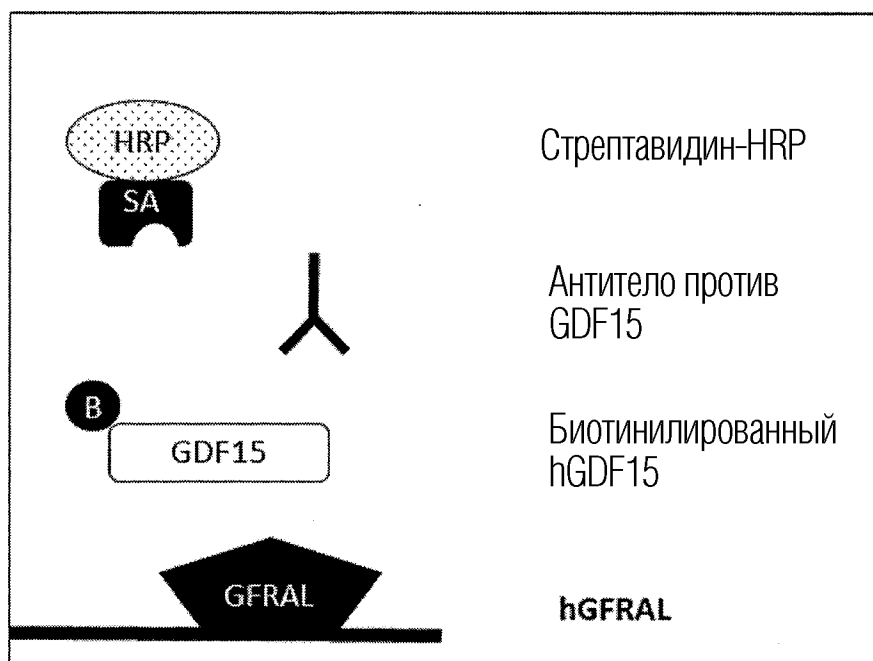


ФИГ. 10

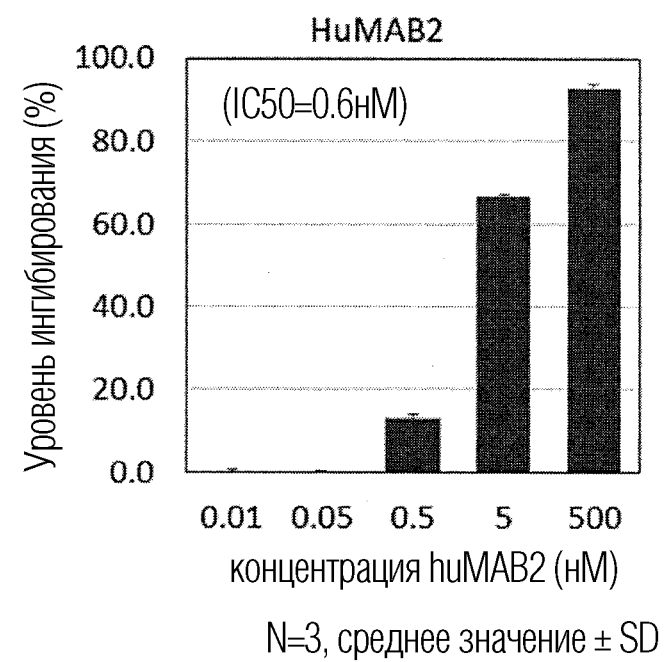
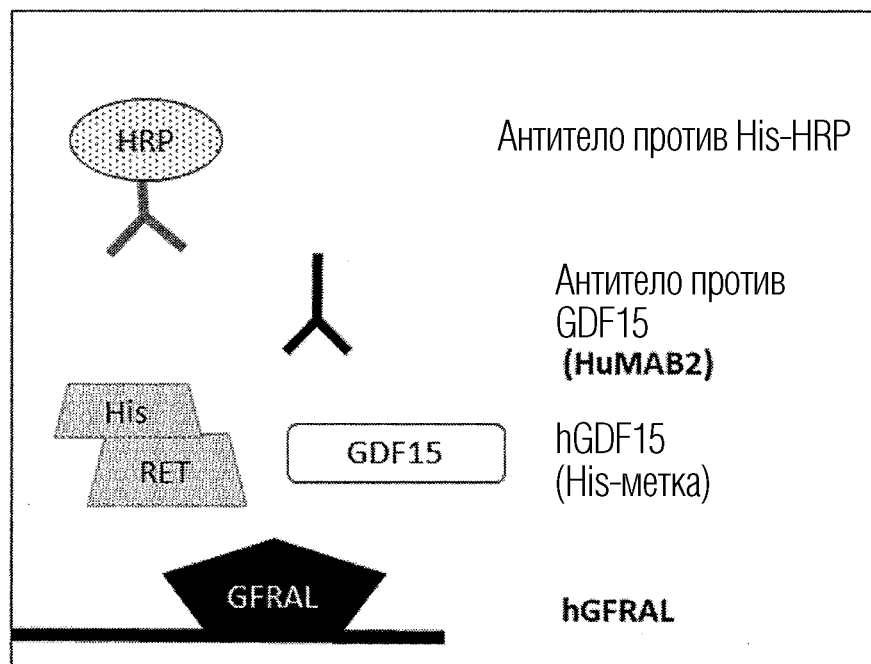
Комбинация модифицированных Н- и L-цепей



ФИГ. 11

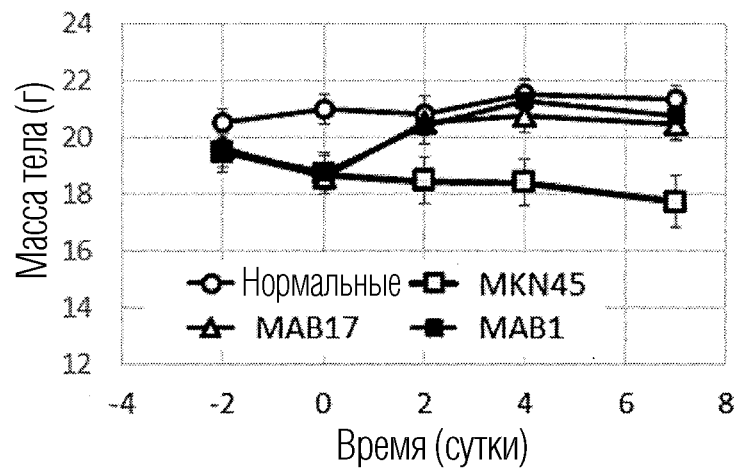


ФИГ. 12



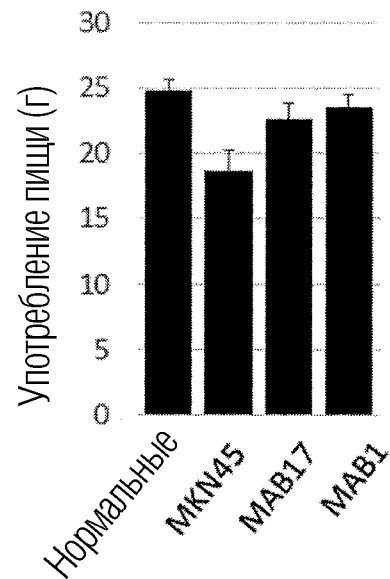
ФИГ. 13

Изменение массы тела

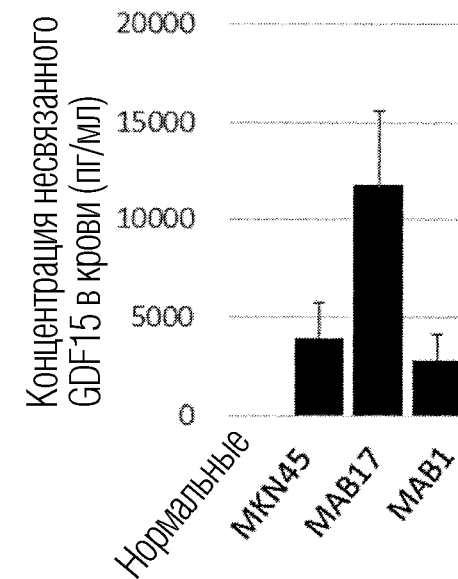


N=5, среднее значение $\pm$ SEM

Совокупное употребление пищи



Концентрация несвязанного GDF15 в крови



15/15

ФИГ. 14