

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291572 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.20

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.19

(54) ИНГИБИТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 20158553.6
(32) 2020.02.20
(33) EP
(86) PCT/EP2021/054215
(87) WO 2021/165499 2021.08.26
(71) Заявитель:
ЭНТЕРА С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Амабиле Джованни (IT)
(74) Представитель:
Нагорных И.М. (RU)

(57) Изобретение относится к ингибиторам IGFBP5 и/или по меньшей мере одного из его рецепторов, где указанный ингибитор обладает противофиброзным действием, способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные ингибиторы, и их применению. В частности, изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с IGFBP5 человека и/или по меньшей мере с одним из его рецепторов.

A1

202291572

202291572

A1

ИНГИБИТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к ингибиторам IGFBP5 и/или, по меньшей мере, одного из его рецепторов, где указанный ингибитор обладает противофиброзным действием, способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные ингибиторы, и их применению. В частности, изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с IGFBP5 человека и/или, по меньшей мере, с одним из его рецепторов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

IGFBP5

Белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста, составляют семейство из шести связывающих белков, которые модулируют биодоступность инсулиноподобных факторов роста (IGF). Среди них, связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 5 (IGFBP5), является наиболее консервативным членом семейства IGFBP (Schneider, et al. *Journal of Endocrinology* 172, 423-440 (2002)); он связывает IGF с высокой аффинностью, образуя тройной комплекс с IGF-1 или -2 и кислотолабильной субъединицей (ALS) (Baxter et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278: E967-E976 (2000)).

В дополнение к его способности регулировать доступность IGF, также было показано, что IGFBP5 обладает IGF-независимыми функциями (Schneider, et al. *Journal of Endocrinology* 172, 423-440 (2002)). Действительно, он способен способствовать фиброзу напрямую, индуцируя экспрессию генов внеклеточного матрикса (ECM) и косвенно, повышая уровни других факторов роста с профиброзной активностью, таких как фактор роста соединительной ткани (CTGF), что приводит к дальнейшему увеличению продуцирования ECM. Помимо регулирования генов ECM и фактора роста, IGFBP5 также увеличивает экспрессию лизилоксидазы (LOX), фермента, ответственного за перекрестное сшивание матрикса, делая ECM более резистентным к протеолитической деградации. Более того, IGFBP5 может связывать компоненты ECM и защищать их от деградации, тем самым способствуя накоплению ECM и фиброзу, а также изменению структуры и функции ткани. Кроме того, IGFBP5 способствует собственной экспрессии, создавая петлю положительной обратной связи (Nguyen et al. *Frontiers in Endocrinology.* 9: 601 (2018)). IGFBP5 также является важным медиатором фиброза, предшествующим известным профиброзным факторам, как

и подачей сигнала трансформирующего фактора роста бета (TGF- β). Все эти данные убедительно свидетельствуют о том, что IGFBP5 проявляет свою профиброзную активность, непосредственно индуцируя экспрессию большинства ECM и профиброзных генов. Наконец, в то время как большинство лекарственных средств таргетируют только один единственный профиброзный фактор ниже каскада, таргетируя IGFBP5, мы сможем заблокировать весь путь с последующим подавлением нескольких профиброзных факторов и генов ECM.

Насколько нам известно, не существует коммерчески доступных моноклональных антител против IGFBP5, способных ингибировать профиброзную активность IGFBP5 и другие неблагоприятные воздействия на ткани/клетки-мишени.

IGFBP5 при идиопатическом легочном фиброзе

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) представляет собой неопухоловой хронический легочный синдром, характеризующийся аберрантным накоплением фибробластов/миофибробластов и прогрессирующим аномальным ремоделированием легочной паренхимы, с последующим рубцеванием и разрывом ее структуры и функции. Несмотря на значительный недавний прогресс, современные схемы лечения в значительной степени бесперспективны со средней выживаемостью менее трех лет с момента постановки диагноза (Sureshbabu et al. *Pulmonary Medicine*. 517687 (2011)).

Центральным событием при ИЛФ является аномальная пролиферация и миграция фибробластов в альвеолярное пространство после повреждения легких. Хотя в нормальных условиях фибробласты важны для заживления ран и образования соединительной ткани, их функция в фиброзированном легком выходит из-под контроля, что приводит к образованию фибробластных очагов, состоящих из высокопролиферативных фибробластов, определенных иммунных клеток и избыточного отложения белка ECM. Следствием этих процессов являются непропорциональные уровни рубцовой ткани, изменения альвеолярного каркаса, изменения структуры легочного эпителия, уплотнение функциональной легочной ткани, потеря газообменной функции легкого и резкое снижение насыщения крови кислородом. (Coward, et al. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 4, 367-388 (2010)).

Было показано, что IGFBP5 увеличивается во внеклеточной среде, когда первичные фибробласты культивируются из фиброзных тканей легких пациентов с ИЛФ, и этот IGFBP5 откладывается в ECM, продуцируемом этими клетками.

Более того, опосредованная аденовирусом экспрессия IGFBP5 или добавление рекомбинантного IGFBP5 приводит к увеличению продуцирования ECM первичными нормальными фибробластами легких взрослых (Pilewski et al. *Am J Pathol* 166(2):399-407 (2005)).

Интересно, что было также замечено, что у трансгенных мышей для модели дермального фиброза у мышей используется избыточная экспрессия IGFBP5 для стимулирования профиброзной среды, приводящей к активации фибробластов, превращению миофибробластов и повышенному отложению ECM (Yasuoka et al., *Am. J. of Pathology* 169(5):1633-42. (2006)). Используя эту модель, было показано, что IGFBP5 проявляет свои профиброзные эффекты IGF-независимым образом (Yasuoka et al. *Plos One* 9(2) 2014).

IGFBP5 при склеродермии

Системный склероз (СС) представляет собой редкое системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани, характеризующееся васкулопатией, нарушением иммунной регуляции и прогрессирующим фиброзом, поражающее, в первую очередь, кожу, желудочно-кишечный тракт, легкие, сердце и почки (Henes et al. *Haematologica*. (2020)). Это связано с высокой смертностью, связанной с заболеванием, и основные причины смерти связаны с вовлечением сердца, легких и почек. До сих пор не существует эффективного лечения для профилактики или остановки прогрессирования фиброза при СС и других фиброзирующих заболеваниях (Tyndall et al. *Ann Rheum Dis*. 69(10):1809-1815 (2010)).

Чрезмерный фиброз кожи и внутренних органов обусловлен пролиферацией фибробластов и избыточной продукцией ECM (Henes et al. *Haematologica*. (2020)). Фиброзные изменения приводят к разрушению нормальных гистологических структур в коже и других органах.

IGFBP5, по-видимому, участвует в ранних стадиях фиброза и может быть иницирующим событием в продуцировании ECM, предполагая его участие в развитии фиброза при СС. На самом деле было показано, что экспрессия IGFBP5 на уровне мРНК и белка повышена *in vitro* в первичных фибробластах, культивированных из пораженной болезнью кожи пациентов с СС, по сравнению с кожей их здоровых близнецов. Также было продемонстрировано, что IGFBP5 индуцирует продуцирование коллагена и фибронектина (FN1) из фибробластов и индуцирует трансдифференциацию фибробластов/миофибробластов *in vitro* и *in vivo* (Yasuoka et al., *American Journal Of Pathology* 169(5):1633-42. (2006)). Более

того, сверхэкспрессия IGFBP5 *in vivo* с использованием дефектного по репликации аденовируса индуцировала фиброз кожи у мышей, который включал увеличение толщины дермы и увеличение толщины пучков коллагена (Henes et al. *Haematologica*. (2020)). Повышенная экспрессия альфа-актина гладких мышц (α -SMA) и виментина в фибробластах кожи также была очевидна при сверхэкспрессии IGFBP5.

IGFBP5 сверхэкспрессируется при СС и ИЛФ (Nguyen X-X, Muhammad L, Nietert PJ and Feghali-Bostwick C (2018) *Front. Endocrinol.* 9:601.doi: 10.3389/fendo.2018.00601, что позволяет предположить, что стратегии ингибирования функции IGFBP5 могут быть эффективными для уменьшения фиброза.

Таким образом, существует потребность в сильнодействующих и специфических ингибиторах IGFBP5, в частности, в нейтрализующих антителах.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что нарушение, нейтрализация или блокада оси IGFBP5, включая IGFBP5 и любой из его рецепторов, оказывает благотворное влияние на фиброз.

В настоящем документе описаны ингибиторы IGFBP5 и/или по меньшей мере, одного из его рецепторов, при этом указанные ингибиторы обладают антифиброзной активностью.

Антифиброзную активность можно измерить любыми способами, известными в данной области техники, в том числе описанными в настоящем документе. Считается, что выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают антифиброзным действием, когда фиброз ингибируется, по меньшей мере, на 10% по сравнению с контрольным состоянием без антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Предпочтительно, считается, что ингибитор оказывает антифиброзное действие, когда фиброз ингибируется, по меньшей мере, на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с контрольным состоянием без антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Предпочтительно, ингибитор IGFBP5 и/или, по меньшей мере, один из его рецепторов предназначен для лечения и/или профилактики фиброза или фиброзного состояния.

Еще более предпочтительно, указанный ингибитор выбран из группы, состоящей из:

а) полипептида;

- b) полинуклеотида или полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид;
- c) вектора, содержащего или экспрессирующего указанный полинуклеотид;
- d) генетически сконструированной клетки-хозяина, экспрессирующей указанный полипептид или указанный полинуклеотид;
- e) малой молекулы;
- f) пептида, белка, антитела, антисмыслового олигонуклеотида, микроРНК, антисмыслового вектора экспрессии или рекомбинантного вируса.

Более предпочтительно, указанный ингибитор представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с IGFBP5 человека или, по меньшей мере, с одним из его рецепторов, где указанное выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают противофиброзным действием.

Предпочтительно ингибитор ингибирует, уменьшает или нейтрализует образование α SMA, индуцированное профиброзным медиатором, и/или который ингибирует, уменьшает или нейтрализует образование FN1, индуцированное профиброзным медиатором.

Предпочтительно, ингибитор представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с IGFBP5 человека и обладает антифиброзной активностью.

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- a. переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:
 - i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 и 5;
 - ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11; и
 - iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 и 26; и/или
- b. переменный домен легкой цепи (VL), содержащий:
 - i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 и 36;
 - ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности,

выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60.

Еще более предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1; и/или

b. переменный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1.

Еще более предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1; и/или

б. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно такой, как показано в таблице 5.1.

Еще более предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. последовательность вариабельного домена тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 и 75 или

б. последовательность вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, и 90 или

с. вариабельный домен тяжелой цепи (а) и вариабельный домен легкой

цепи (b).

Еще более предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из: A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело B06 или B09.

Еще более предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент CDR1, CDR2 и CDR3 VH выбраны из таблицы 2, и CDR1, CDR2 и CDR3 VL выбраны из таблицы 3.

Еще более предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют константу аффинности ниже или равную 10^{-8} М для IGFBP5 человека.

Также описано выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое:

(a) специфически связывается с эпитопом на IGFBP5, где указанный эпитоп представляет собой тот же или аналогичный эпитоп, что и эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(b) перекрестно конкурирует за связывание с моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(c) демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как любой из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G0, как определено в таблицах 2-8; или

(d) имеет одно или несколько биологических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной из, например, любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8 и; или

(e) имеет одно или несколько фармакокинетических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной, например, из любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8.

В предпочтительном варианте осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано выше:

(a) специфически связывается с эпитопом на IGFBP5, где указанный эпитоп

представляет собой тот же или аналогичный эпитоп, что и эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(b) перекрестно конкурирует за связывание с моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(c) демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как любой из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G0, как определено в таблицах 2-8; или

(d) имеет одно или несколько биологических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекула антитела, выбранная из, например, любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8 и; или

(e) имеет одно или несколько фармакокинетических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной, например, из любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8.

Предпочтительно выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено выше, представляет собой человеческое или гуманизированное антитело, предпочтительно, антитело IgG2 или IgG4, предпочтительно, каппа-антитело IgG2, лямбда-антитело IgG2, каппа-антитело IgG4 или лямбда-антитело IgG4.

Предпочтительно, ингибитор, описанный выше, уменьшает или ингибирует связывание IGFBP5, по меньшей мере, с одним из его рецепторов, предпочтительно, по меньшей мере, один рецептор представляет собой интегрин $\alpha 2 \beta 1$ или интегрин $\alpha \nu \beta 6$.

Еще более предпочтительно, ингибитор, как определено выше, i) снижает или ингибирует продуцирование внеклеточного матрикса, и/или ii) снижает или ингибирует отложение внеклеточного матрикса, и/или iii) снижает или ингибирует продуцирование коллагена и/или фибронектина в первичных фибробластах легких, и/или iv) снижает или ингибирует отложение коллагена и/или фибронектина в первичных фибробластах легких.

В настоящем документе описан выделенный полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено выше, предпочтительно,

указанный полинуклеотид представляет собой кДНК.

В настоящем документе описан вектор, содержащий полинуклеотид, как определено выше, предпочтительно, указанный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, вирусного вектора, неэписомного вектора млекопитающего, вектора экспрессии и рекомбинантного вектора экспрессии.

В настоящем документе описана выделенная клетка, содержащая полинуклеотид или вектор, как определено выше, предпочтительно, указанная выделенная клетка представляет собой гибридому, или клетку яичника китайского хомячка (СНО), или эмбриональную клетку почки человека (НЕК293).

Предпочтительно, ингибитор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или полинуклеотид, или вектор, или клетка, как определено выше, предназначены для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно, для применения при лечении и/или профилактике фиброза или фиброзного состояния, предпочтительно склеродермии или легочного фиброза, предпочтительно, очаговой склеродермии, фиброза в результате реакции трансплантат против хозяина (GVHD), келоидного и гипертрофического рубца, субэпителиального фиброза, эндомикардиального фиброза, фиброза матки, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, нефрогенного системного фиброза, рубцевания после операции, астмы, аберрантного заживления ран и многоочагового фибросклероза, криптогенного фиброзирующего альвеолита (CFA) и идиопатического легочного фиброза (IPF).

В настоящем документе описана фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или полинуклеотид, или вектор, или клетку, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель, предпочтительно, для применения при лечении фиброза или фиброзного состояния, предпочтительно, указанная композиция дополнительно содержит терапевтический агент.

Терапевтический агент может представлять собой нинтеданиб и пирфенидон.

В настоящем описании описаны антитела и их антигенсвязывающий фрагмент, обладающие антифиброзной активностью.

В некоторых вариантах осуществления, описаны способы ингибирования фиброза *in vivo* или *in vitro*. В дополнительных вариантах осуществления, описаны способы лечения фиброза у субъекта. В некоторых конкретных неограничивающих примерах, у субъекта имеется склеродермия или легочный

фиброз.

Вышеупомянутые и другие признаки и преимущества станут более очевидными из следующего подробного описания нескольких вариантов осуществления со ссылками на прилагаемые чертежи.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Влияние анти-IGFBP5 mAb на анализ фибробластно-миофибробластного перехода (FMT) при воздействии TGF- β 1. Первичные фибробласты легких человека от трех доноров IPF (IPF05, IPF06 и IPF07) индуцируют 1,25 нг/мл TGF- β 1 для индукции FMT. Анти-IGFBP5 mAb, B06 (A) и B09 (B) тестируют в анализе FMT для проверки их способности ингибировать экспрессию α SMA. Носитель 2: клетки, обработанные 3,6% PBS и 1,25 нг/мл TGF- β 1.

Фигура 2. Действие анти-IGFBP5 mAb на анализ эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) при воздействии TGF- β 1. Клетки первичного бронхиального эпителия человека (HBEC) от трех доноров IPF (IPF05, IPF06 и IPF07) индуцируют 5 нг/мл TGF- β 1, чтобы вызвать EMT. Анти-IGFBP5 mAb, B06 (A) и B09 (B) тестируют в анализе EMT для проверки их способности ингибировать экспрессию FN1. Анти-IGFBP5 mAb B06 продемонстрировало зависящее от концентрации ингибирование опосредованной TGF- β 1 экспрессии FN1 в тканях доноров, больных IPF. Носитель 2: клетки, обработанные 3,6% PBS и 5 нг/мл TGF- β 1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Если не указано иное, технические термины используются в соответствии с общепринятым применением в данной области техники.

Антитела по изобретению специфически связывают IGFBP5 человека.

Как обсуждается в настоящем документе, эти антитела вместе называются «анти-IGFBP5 антитела». Все такие антитела охватываются обсуждением в настоящем документе. Соответствующие антитела можно использовать по отдельности или в комбинации в способах по изобретению.

Под «антителами, которые специфически связываются» с IGFBP5 подразумевается, что антитела не будут по существу перекрестно реагировать с другим, негомологичным полипептидом человека. Под «по существу перекрестной реакцией» подразумевается, что антитело или его фрагмент имеют аффинность связывания с негомологичным белком, которая составляет менее 10%, более предпочтительно, менее 5%, и еще более предпочтительно, менее 1% от

аффинности связывания к IGFBP5.

В различных вариантах осуществления, антитело, которое «специфически связывает» IGFBP5, как используется в настоящем документе, включает антитела, которые связывают IGFBP5 человека с K_D менее примерно 10^{-6} М, менее примерно 5×10^{-7} М, менее примерно 3×10^{-7} М, менее примерно 2×10^{-7} М, менее примерно 10^{-7} М, менее примерно 9×10^{-8} М, менее примерно 8×10^{-8} М, менее примерно 7×10^{-8} М, менее примерно 6×10^{-8} М, менее примерно 5×10^{-8} М, менее примерно 4×10^{-8} М, менее примерно 3×10^{-8} М, менее примерно 2×10^{-8} М, менее примерно 10^{-8} М, менее примерно 5×10^{-9} М, менее примерно 4×10^{-9} М, менее примерно 3×10^{-9} М, менее примерно 2×10^{-9} М, менее примерно 10^{-9} М или примерно 5×10^{-10} М, по данным анализа поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы BIAcore™ (Biacore Life Sciences, подразделение GE Healthcare, Piscataway, NJ) или анализов кинетического исключения или с использованием анализа биомолекулярного взаимодействия, выполняемого платформой Octet, как описано в настоящем документе.

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле, известном в данной области техники, включая все полипептиды, описанные как антитела в Sumit G, Wei W, Tsutomu and Satoshi O, *Antibodies* 2013; 2: 452-500, включенной сюда в качестве ссылки.

Например, термин «антитело», используемый в настоящем документе, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что фрагмент проявляет желаемую антигенсвязывающую активность (антигенсвязывающие фрагменты).

Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или, эквивалентно, «антигенсвязывающая часть» антитела и подобного, используемые в настоящем документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который содержит часть антитела, и которое специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полноразмерного антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК,

кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать химическим путем или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот, и так далее.

Как и в случае молекул полноразмерного антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, два различных антигенсвязывающих фрагмента, где каждый антигенсвязывающий фрагмент способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене.

В конкретных вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит, по меньшей мере, один вариабельный домен, ковалентно связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие типовые конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть найдены в антигенсвязывающем фрагменте антитела, включают: (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; и (xiv) VL-CL. В любой конфигурации вариабельного и константного доменов, включая любую из типовых конфигураций, перечисленных выше, вариабельный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область в различных вариантах осуществления может состоять, по меньшей мере, из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела может в различных вариантах осуществления содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из перечисленных выше конфигураций вариабельного и константного доменов в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами VH

или VL (например, дисульфидной(ыми) связью(ями)).

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела дополнительно включает однодоменные антитела.

Однодоменное антитело представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело происходит от переменного домена тяжелой цепи антитела верблюдовых (также называемых нанотелами или фрагментами VHH). В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой автономный переменный домен тяжелой цепи человека (aVH) или фрагменты VNAR, полученные от акул.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab фрагменты; (ii) F(ab')₂ фрагменты; (iii) Fd фрагменты; (iv) Fv фрагменты; (v) одноцепочечные Fv (scFv); (vi) dAb фрагменты; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как CDR3 пептид), или ограниченный FR3-CDR3-FR4 пептид. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела и двухвалентные нанотела), небольшие модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акул, также относятся к выражению «антигенсвязывающий фрагмент», используемому в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любую аминокислотную композицию и обычно будет содержать, по меньшей мере, одну CDR, которая примыкает или находится в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен VH, связанный с доменом VL, домены VH и VL могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен VH или VL.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, также включает

ADC (конъюгат антитело-лекарственное средство) и слитые антитела полезной нагрузки.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающая молекула» относится в самом широком смысле к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. Примерами антигенсвязывающих молекул являются антитела, включая антигенсвязывающие фрагменты антител, и каркасные антигенсвязывающие белки.

Термин «антигенсвязывающая группа» относится к части антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. Антигенсвязывающие группы включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как scFv, которые способны специфически связываться с антигеном на клетке-мишени. В конкретном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент способен направлять объект, к которому он присоединен, такой как клетка, в сайт-мишень.

Кроме того, антигенсвязывающие группы, способные к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени, включают каркасные антигенсвязывающие белки, как определено в настоящем документе ниже, например, связывающие домены, которые основаны на сконструированных повторяющихся белках или сконструированных повторяющихся доменах, таких как сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPin) (см. например, WO 2002/020565) или липокалины (антикалин).

Разработаны белки анкириновых повторов (DARPin), полученные из анкирина, представляющего собой семейство белков, опосредующих присоединение интегральных мембранных белков к цитоскелету. Одиночный анкириновый повтор представляет собой мотив из 33 остатков, состоящий из двух альфа-спиралей и бета-витка. Их можно сконструировать для связывания различных антигенов-мишеней путем рандомизации остатков в первой альфа-спирали и бета-витке каждого повтора. Их интерфейс связывания можно увеличить, увеличив количество модулей (способ созревания аффинности). Дополнительные подробности см. в J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) и J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) и US20040132028.

В некоторых вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие молекулы, предложенные в настоящем документе, изменены для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антигенсвязывающей группы. Гликозилированные варианты молекул могут быть удобно получены путем

изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется один или несколько сайтов гликозилирования. Когда антигенсвязывающая молекула содержит Fc область, связанный с ней углевод может быть изменен. В одном аспекте, предложены варианты антигенсвязывающих молекул, имеющих углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc области. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию ADCC, см., например, публикации патентов США № US 2003/0157108 (Presta, L.) или US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Дополнительные варианты антигенсвязывающих молекул по изобретению включают молекулы с расщепленными пополам олигосахаридами, например, в которых двуантенный олигосахарид, присоединенный к Fc области, расщеплен пополам с помощью GlcNAc. Такие варианты могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC, см., например, WO 2003/011878 (Jean-Maret et al.); патент США № 6,602,684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также предусмотрены варианты, по меньшей мере, с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенным к Fc области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC и описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.).

В некоторых вариантах осуществления, может быть желательно создать сконструированные с цистеином варианты антитела или антигенсвязывающей молекулы по изобретению, например, «thioMAb», в которых один или несколько остатков молекулы заменены цистеиновыми остатками. В конкретных вариантах осуществления, замещенные остатки находятся на доступных сайтах молекулы. Замещая эти остатки цистеином, реакционноспособные тиоловые группы располагаются на доступных сайтах антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими группами, такими как группы лекарственного средства или группы линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления, любой один или несколько из следующих остатков могут быть заменены цистеином: V205 (нумерация Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc области тяжелой цепи. Сконструированные с цистеином антигенсвязывающие молекулы могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7,521,541.

В некоторых аспектах, антитело или антигенсвязывающие молекулы,

предложенные в настоящем документе, могут быть дополнительно модифицированы, чтобы содержать дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области и легко доступны. Группы, подходящие для дериватизации антитела или антигенсвязывающей молекулы, включают, но не ограничены ими, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничены ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры пролипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликолевый пропиональдегид может иметь преимущества в производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, и если присоединено более одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, можно определить на основе соображений, включая, но не ограничиваясь ими, конкретные свойства или функции антитела, которое необходимо улучшить, а также то, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях и т. д.

В другом аспекте, предложены конъюгаты антитела и небелковой группы, которые можно селективно нагревать под воздействием излучения. В одном варианте осуществления, небелковая группа представляет собой углеродную нанотрубку (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает, помимо прочего, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковую группу до температуры, при которой клетки, расположенные ближе к антителу-небелковой группе, погибают. В другом аспекте, могут быть получены иммуноконъюгаты антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем документе. «Иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичными молекулами, включая, но не

ограничиваясь ими, цитотоксический агент.

Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления, константная область представляет собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Настоящее изобретение охватывает, в различных вариантах осуществления, антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнирной, CH2 или CH3 области, которые могут быть желательны, например, при производстве, для повышения выхода желаемой формы антитела. В некоторых вариантах осуществления, например, антитела, описанные в настоящем документе, содержат константную область IgG4 человека. В конкретных вариантах осуществления, константная область IgG4 имеет единственную аминокислотную замену в шарнирной области шарнира IgG4 человека, что снижает обмен плечами Fab (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит одну или несколько мутаций в константной области, которые увеличивают время полужизни в сыворотке, включая мутации, описанные в патентах США №№ 7,083,784, 8,323,962 и Dall'Aqua et al., *J. Biol. Chem.* 281(33):23514-23524 (2006); Hinton et al., *J. Immunology* 176:346-356 (2006); Yeung et al., *J. Immunology* 182:7663-7671 (2009); и Petkova et al., *Intn'l Immunology*, 18: 1759-1769 (2006), полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «антитело человека», используемый в настоящем документе, предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека, представленные в изобретении, могут, тем не менее, в различных вариантах осуществления, включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR, и, в некоторых вариантах осуществления, CDR3. Однако термин «антитело человека», используемый в настоящем документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR

получены из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, которые были привиты на каркасные последовательности человека.

Термин «рекомбинантное антитело человека», используемый в настоящем документе, включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных средств, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин (описанную ниже), антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител человека (описанных ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления, такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используется животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и связаны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

«Выделенное антитело», как используется в настоящем документе, означает антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или выделено, по меньшей мере, из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было выделено или удалено, по меньшей мере, из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой это антитело существует в природе или продуцируется в природе, является «выделенным антителом». В различных вариантах осуществления, выделенное антитело также включает антитело *in situ* внутри рекомбинантной клетки. В других вариантах осуществления, выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты, по меньшей мере, одной стадии очистки или выделения. В различных вариантах осуществления, выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными рядом аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах, эпитоп может включать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Анти-IGFBP5 антитела, описанные в настоящем документе и пригодные для способов, представленных в настоящем документе, могут, в различных вариантах осуществления, включать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител.

Настоящее изобретение включает, в различных вариантах осуществления, антитела и способы, включающие применение антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, где одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR областей, мутированы соответствующим(и) остатком(ами) последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или соответствующим(и) остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии человека, или консервативной аминокислотной заменой соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»).

Могут быть сконструированы многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько

индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, все остатки каркаса и/или CDR в доменах VH и/или VL мутированы обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления, только некоторые остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или несколько остатков каркаса и/или CDR мутированы в соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально получено антитело). Кроме того, антитела могут содержать любую комбинацию двух или нескольких мутаций зародышевой линии в каркасной и/или CDR областях, например, где некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать на одно или несколько желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), снижение иммуногенности и т.д. Применение антител и антигенсвязывающих фрагментов, полученных таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает анти-IGFBP5 антитела и способы, включающие использование анти-IGFBP5 антител, содержащих варианты любой из описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает применение анти-IL-6R антител, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из

аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе.

Термин «биоэквивалент», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, имеющей аналогичную биодоступность (скорость и степень доступности) после введения в той же молярной дозе и в аналогичных условиях (например, одним и тем же путем введения), так что можно ожидать, что эффект в отношении как эффективности, так и безопасности, будет по существу таким же, как у молекулы сравнения. Две фармацевтические композиции, содержащие анти-IGFBP5 антитело, являются биоэквивалентными, если они фармацевтически эквивалентны, что означает, что они содержат одинаковое количество активного ингредиента (например, антитела IGFBP5), в одной и той же дозированной форме, для одного и того же пути введения, и удовлетворяют одинаковым или сопоставимым стандартам. Биоэквивалентность можно определить, например, путем исследования *in vivo*, сравнивающего фармакокинетический параметр для двух композиций. Параметры, обычно используемые в исследованиях биоэквивалентности, включают пиковую концентрацию в плазме (C_{max}) и площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в плазме от времени (AUC).

Изобретение, в определенных вариантах осуществления, относится к антителам и способам, включающим введение субъекту антитела, которое содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы: SEQ ID No. 61 - SEQ ID No. 75, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы: SEQ ID No. 76 - SEQ ID No. 90. В описании представлены фармацевтические композиции, содержащие такое антитело, и способы применения этих композиций.

Антитело вводят субъекту в различных вариантах осуществления в составе, включающем подходящие носители, эксципиенты и другие агенты для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и подобного, и подходящем для внутривенной или подкожной инъекции.

Препараты для инъекций могут быть приготовлены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций

используют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты, и т. д., которые можно использовать в комбинации с соответствующим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 20 или 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленным таким образом препаратом для инъекций можно заполнить соответствующую ампулу.

Антитело по изобретению можно вводить субъекту с использованием любого приемлемого устройства или механизма. Например, введение можно осуществлять с помощью шприца и иглы или многоразовой ручки и/или автоинъектора.

Способы по настоящему изобретению включают использование множества многоразовых ручек и/или автоинъекторов для введения антитела (или фармацевтического состава, содержащего антитело). Примеры таких устройств включают, но не ограничены ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), ручки DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), ручки HUMALOG MIX 75/25™, ручки HUMALOG™, ручки HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), ручки BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых ручек и/или автоинъекторов, используемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничены ими, ручки SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), ручки HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), автоматический инъектор DAI® (SHL Group) и любой автоматический инъектор с технологией PUSHCLICK™ (SHL Group), и это лишь некоторые из них.

В одном варианте осуществления, антитело вводят с помощью предварительно заполненного шприца. В другом варианте осуществления,

антитело вводят предварительно заполненным шприцем, содержащим систему безопасности. Например, система безопасности предотвращает случайный укол иглой. В различных вариантах осуществления, антитело вводят с помощью предварительно заполненного шприца, содержащего систему безопасности ERIS™ (West Pharmaceutical Services Inc.). См. также патенты США №№ 5,215,534 и 9,248,242, полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки.

В другом варианте осуществления, антитело вводят с помощью автоинъектора. В различных вариантах осуществления, антитело вводят с помощью автоинъектора с технологией PUSHCLICK™ (SHL Group). В различных вариантах осуществления, автоинъектор представляет собой устройство, содержащее шприц, которое позволяет вводить дозу композиции и/или антитела субъекту. См. также патенты США №№ 9,427,531 и 9,566,395, полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки.

В соответствии с изобретением, «субъект» означает субъекта-человека или пациента-человека.

«Фиброз» представляет собой образование или развитие избыточной волокнистой соединительной ткани в органе или ткани в качестве репаративного или реактивного процесса, в отличие от образования фиброзной ткани в качестве нормального компонента органа или ткани. Это основная гистопатологическая особенность различных клинических состояний. Многие органы подвержены патологическому фиброзу, включая, но не ограничиваясь ими, кожу, легкие, сердце и желудочно-кишечный тракт. Изобретение относится к ингибитору, который специфически воздействует на патогенез фиброза, обладая «антифиброзной активностью или эффектами», воздействуя на IGFBP5, который является профиброзным медиатором.

Фиброз определяется накоплением волокнистой соединительной ткани (компонентов внеклеточного матрикса (ECM), таких как коллаген и фибронектин) в воспаленной или поврежденной ткани и вокруг нее, что может привести к необратимому рубцеванию, нарушению функции органов и, в конечном итоге, к смерти. Фиброз является патологическим признаком большинства хронических воспалительных заболеваний. Фиброз поражает почти все ткани в организме. (Schruf et al. Respiratory Research (2019) 20:87).

После активации профиброзными стимулами, фибробласты дифференцируют в агрессивный фенотип, который секретирует избыточное количество богатого коллагеном внеклеточного матрикса и, таким образом,

составляет первичный патологический фенотип фибробластов (Geng et al. Respiratory Research (2015) 16:124).

Типовыми фиброзными состояниями являются склеродермия, идиопатический легочный фиброз, очаговая склеродермия, фиброз в результате реакции трансплантат против хозяина (GVHD), келоидный и гипертрофический рубец и субэпителиальный фиброз, эндомиокардиальный фиброз, фиброз матки, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, нефрогенный системный фиброз, рубцевание после операции, астма, аберрантное заживление ран, гломерулонефрит и мультифокальный фибросклероз.

«Идиопатический легочный фиброз» представляет собой состояние, также известное как криптогенный фиброзирующий альвеолит (CFA), которое представляет собой хроническую прогрессирующую форму заболевания легких, характеризующуюся фиброзом поддерживающего каркаса (интерстиция) легких. По определению, этот термин используется только тогда, когда причина легочного фиброза неизвестна («идиопатический»). Когда легочная ткань пациентов с IPF исследуется патологоанатомом под микроскопом, она показывает характерный набор гистологических/патологических признаков, известных как обычная интерстициальная пневмония (UIP). UIP характеризуется прогрессирующим рубцеванием обоих легких с вовлечением поддерживающего каркаса (интерстиция) легкого.

Ингибирование или лечение заболевания: Ингибирование заболевания, такого как фиброз, относится к ингибированию или замедлению полного развития заболевания. В нескольких примерах, ингибирование заболевания относится к уменьшению симптомов фиброза, таких как образование рубцовой ткани или увеличение диапазона движений или уменьшение боли. «Лечение» относится к терапевтическому вмешательству, которое ослабляет признак или симптом заболевания или патологического состояния, связанного с заболеванием, такого как фиброз.

«Склеродермия» представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся фиброзом (или уплотнением), сосудистыми изменениями и аутоантителами. Существует две основные формы, одна из которых представляет собой ограниченную форму системной склеродермии, которая включает ограниченную кожную склеродермию, в основном поражающую руки, руки и лицо, хотя часто встречается легочная гипертензия. В то же время диффузная кожная склеродермия (или системный склероз) быстро прогрессирует

и поражает большие участки кожи и один или несколько внутренних органов, чаще почки, пищевод, сердце и легкие. Системная склеродермия в обеих формах может привести к летальному исходу. К другим формам склеродермии относятся системная склеродермия, при которой отсутствуют кожные изменения с системными проявлениями, и две локализованные формы, поражающие кожу, но не внутренние органы: очаговая склеродермия и линейная склеродермия. Описанные антитела можно использовать для лечения любой формы склеродермии.

Терапевтические способы и фармацевтические композиции

Описанные в настоящем документе антитела можно использовать для лечения фиброза, возникающего при некоторых болезненных состояниях. Описанные в настоящем документе антитела могут уменьшать уже возникший фиброз, разрешая существующий фиброз, и/или могут снижать скорость или степень дополнительного фиброза. В нескольких примерах, антитела используются для уменьшения фиброза при патогенных процессах, таких как у субъекта.

Таким образом, в нескольких вариантах осуществления, способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или нескольких антител, описанных в настоящем документе, для уменьшения фиброза. Любое из описанных в настоящем документе антител можно использовать для уменьшения фиброза. В некоторых вариантах осуществления, антитела можно вводить в виде стандартной дозы.

Подходящие субъекты включают субъектов с фиброзом кожи или легких, но фиброз любой ткани можно лечить с использованием описанных в настоящем документе способов. В одном примере, субъекта имеет склеродермию. В других примерах, у субъекта имеется идиопатический легочный фиброз, очаговая склеродермия, фиброз в результате реакции трансплантат против хозяина (GVHD), келоидный или гипертрофический рубец, субэпителиальный фиброз, эндомиокардиальный фиброз, фиброз матки, миелофиброз, забрюшинный фиброз, нефрогенный системный фиброз, рубцевание после операции, астма, аберрантное заживление ран, гломерулонефрит и мультифокальный фибросклероз.

В дополнительных примерах, способы применяют для лечения системной формы склеродермии, такой как ограниченная кожная склеродермия или диффузная кожная склеродермия (или системный склероз). Способы могут быть

использованы для лечения локализованной формы склеродермии, включая очаговую склеродермию и линейную склеродермию.

Способы могут включать выбор субъекта, нуждающегося в лечении, такого как субъект с фиброзным заболеванием, таким как склеродермия, идиопатический легочный фиброз, очаговая склеродермия, келоидный рубец, гипертрофический рубец или субэпителиальный фиброз. В типовых применениях, композиции вводят субъекту, страдающему фиброзным заболеванием, таким как склеродермия, идиопатический легочный фиброз, очаговая склеродермия, келоидный рубец, гипертрофический рубец или субэпителиальный фиброз, или любое из перечисленных выше нарушений, в количестве, достаточном для уменьшения фиброза. Количества, эффективные для этого применения, будут зависеть от тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента и устойчивости иммунной системы пациента. В одном примере, терапевтически эффективным количеством соединения является такое количество, которое обеспечивает либо субъективное облегчение симптома(ов), либо объективно идентифицируемое улучшение, отмеченное клиницистом или другим квалифицированным наблюдателем.

В настоящем документе, предложен способ уменьшения толщины кожи. Способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела, тем самым уменьшая толщину кожи. В другом варианте осуществления предложены способы уменьшения фиброза легких. Способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела, тем самым уменьшая толщину кожи. Любое антитело, описанное в настоящем документе, может быть использовано в этих способах.

В настоящем документе предложены способы снижения экспрессии α SMA или FN1, такие как индуцированная трансформирующим фактором роста (TGF)- β экспрессия α SMA или FN1. Способ включает контакт клетки с эффективным количеством антитела, тем самым снижая экспрессию α SMA или FN1. Способы можно практиковать *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, способы включают сравнение уровня экспрессии α SMA или FN1, продуцируемого клеткой, контактировавшей с антителом, с контролем. Контролем может быть стандартное значение или количество α SMA или FN1, продуцируемое клеткой, не контактировавшей с антителом, например клеткой, контактировавшей с носителем.

Описанное в настоящем документе антитело можно вводить любыми

способами, известными специалисту в данной области техники, либо локально, либо системно, например, путем внутрикожной, подболобочечной, внутримышечной, подкожной, внутрибрюшинной или внутривенной инъекции, но также рассматривается пероральное, назальное, чрескожное или анальное введение. В одном варианте осуществления, введение осуществляют путем подкожной, внутрикожной или внутримышечной инъекции. В другом варианте осуществления, введение осуществляют внутрибрюшинным или подболобочечным введением. Чтобы продлить время, в течение которого антитело доступно для стимуляции ответа, антитело может быть предложено в виде имплантата, масляной инъекции или в виде системы частиц. Система частиц может представлять собой микрочастицу, микрокапсулу, микросферу, нанокapsулу или подобную частицу. (см., например, Banga, выше).

Для лечения кожи, терапевтически эффективное количество, по меньшей мере, антитела может быть введено локально в пораженный участок кожи, например, в виде мази (RGA Jones and A Marino, "Targeted localized use of therapeutic antibodies: a review of non-systemic, topical and oral applications, Crit. Rev. Biotechnol. 36(3):506-520 (2016).

В одном варианте осуществления мазь представляет собой полностью гомогенный полутвердый наружный агент с плотностью, подходящей для легкого нанесения на кожу. Такая мазь может включать жиры, жирные масла, ланолин, вазелин, парафин, воск, твердые мази, смолы, пластмассы, гликоли, высшие спирты, глицерин, воду или эмульгатор и суспендирующий агент. Используя эти ингредиенты в качестве основы, соединение-ловушку можно равномерно смешать. В зависимости от основы, смесь может быть в виде маслянистой мази, эмульгированной мази или водорастворимой мази. Масляные мази используют такие основы, как растительные и животные масла и жиры, воск, вазелин и жидкий парафин. Эмульгированные мази состоят из маслянистого вещества и воды, эмульгированных эмульгатором. Они могут находиться либо в форме масло-в-воде (M/B), либо в форме вода-в-масле (B/M). Форма масло-в-воде (M/B) может представлять собой гидрофильную мазь. Форма вода-в-масле (B/M) изначально лишена водной фазы и может включать гидрофильный вазелин и очищенный ланолин, либо может содержать водопоглощающую мазь (включая водную фазу) и гидратированный ланолин. Водорастворимая мазь может содержать полностью растворимую в воде основу Macrogol в качестве основного ингредиента.

Фармацевтически приемлемые носители включают вазелин, такой как VASELINE®, где вазелин содержит 5% стеарилового спирта, или только вазелин, или вазелин, содержащий жидкий парафин. Такие носители позволяют назначать фармацевтические композиции в формах, подходящих для потребления, таких как таблетки, пилюли, средства с сахарным покрытием, капсулы, жидкие препараты, гели, мази, сиропы, взвеси и суспензии. При локальном введении в клетки пораженного участка или представляющей интерес ткани, по меньшей мере, один С-концевой полипептид эндостатина или полинуклеотид, кодирующий пептид, можно вводить в составе композиции, содержащей синтетический или природный гидрофильный полимер в качестве носителя. Примеры таких полимеров включают гидроксипропилцеллюлозу и полиэтиленгликоль. Одно или несколько антител можно смешать с гидрофильным полимером в подходящем растворителе. Затем растворитель удаляют такими методами, как сушка на воздухе, и остатку затем придают желаемую форму (например, лист) и наносят на сайт-мишень. Составы, содержащие такие гидрофильные полимеры, хорошо сохраняются, так как имеют низкое содержание воды. Во время использования они впитывают воду, превращаясь в гели, которые также хорошо хранятся. В случае листов, жесткость можно отрегулировать путем смешивания многоатомного спирта с гидрофильным полимером, подобным вышеперечисленным, таким как целлюлоза, крахмал и его производные или синтетические полимерные соединения. Сформированные таким образом гидрофильные листы можно использовать. Терапевтически эффективное количество одного или нескольких антител также может быть включено в бинты и повязки.

Для введения путем ингаляции, антитело может быть удобно доставлено в форме аэрозольного спрея из упаковок под давлением или распылителя с использованием подходящего пропеллента, такого как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ. В случае аэрозоля под давлением, дозированная единица может быть определена с помощью клапана для подачи отмеренного количества. Капсулы и картриджи для использования в ингаляторе или инсуффляторе могут быть приготовлены с использованием порошковой смеси соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

В некоторых вариантах осуществления, антитело можно вводить путем ингаляции. Например, его можно вводить в форме аэрозоля, например, с

помощью небулайзера или дозирующего ингалятора. Технологии использования включают небулайзеры с микронасосами (такие как система AEROGEN GO®), струйные небулайзеры, предназначенные для получения крупных фракций мелких частиц (такие как PARI LC STAR®), струйные небулайзеры, развивающие меньший сдвиг во время распыления (такие как HUDSON MICROMIST®) и ультразвуковые небулайзеры (например, DeVilbiss ULTRA-NEB®).

Антитело можно растворить в носителе, таком как солевой раствор, и распылить с использованием устройств, описанных выше. Ассоциированные аэрозоли могут быть собраны с помощью NEXT GENERATION IMPACTOR® (NGI) (MSP Corp., Shoreview, Minn.), в котором используется ряд аэродинамических стадий для разделения и сбора аэрозоля на отдельные фракции в зависимости от размера капель. Поскольку размер капель является основным фактором, определяющим место отложения в легких, это устройство позволяет нам специально изолировать часть жидкого аэрозоля, которая будет откладываться в малых дыхательных путях и альвеолах.

Размер аэрозольных частиц часто выражается в виде массового медианного аэродинамического диаметра (MMAD), параметра, который основан на размере, форме и плотности частиц. Для сферической частицы, MMAD равен $MMD (\rho < 1/2 >)$, где MMD представляет собой медианный диаметр, и ρ представляет собой объемную плотность. Для несферической частицы, MMAD равен $MMD (\rho/x) < 1/2 >$, где X означает коэффициент формы. Таким образом, частицы с плотностью больше единицы будут иметь фактический диаметр меньше, чем их MMAD.

Сайт отложения частиц в дыхательных путях определяется по размеру частиц. В одном примере, используются частицы размером от примерно 1 до примерно 500 микрон, например, используются частицы размером от примерно 25 до примерно 250 микрон или от примерно 10 до примерно 25 микрон. В других вариантах осуществления, используются частицы размером примерно от 1 до 50 микрон. Для использования в дозирующем ингаляторе, для введения в легкие могут использоваться частицы размером менее примерно 10 микрон, такие как частицы размером примерно от 2 до примерно 8 микрон, например, частицы размером примерно от 1 до примерно 5 микрон, например, частицы размером от 2 до 3 микрон.

Терапевтически эффективное количество антитела можно вводить в фармацевтически приемлемом носителе. Фармакологически приемлемые

носители (например, физиологически или фармацевтически приемлемые носители) хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничены ими, забуференные растворы с физиологическим pH (например, с pH от примерно 7,0 до примерно 8,0 или с pH примерно 7,4). Одним конкретным неограничивающим примером физиологически совместимого забуференного раствора является фосфатно-солевой буфер. Другие фармакологически приемлемые носители включают пенетранты, которые особенно подходят для фармацевтических составов, предназначенных для местного применения (например, при нанесении на хирургические раны для ускорения заживления).

Описанные в настоящем документе фармакологические композиции облегчают использование, по меньшей мере, одного антитела либо *in vivo*, либо *ex vivo* для уменьшения фиброза. Такая композиция может подходить для доставки активного ингредиента любому подходящему субъекту и может быть изготовлена способом, который сам по себе известен, например, с помощью обычных процессов смешивания, растворения, гранулирования, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации. Фармакологические композиции могут быть составлены обычным образом с использованием одного или нескольких фармакологически (например, физиологически или фармацевтически) приемлемых носителей, а также необязательных вспомогательных веществ, облегчающих переработку активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтике. Правильный состав зависит от выбранного пути введения. Таким образом, для инъекции, активный ингредиент может быть приготовлен в виде водных растворов. Для введения через слизистую оболочку, в препарате используются пенетранты, соответствующие барьеру, через который необходимо проникнуть. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники.

Для перорального введения, активный ингредиент можно комбинировать с носителями, подходящими для включения в таблетки, пилюли, капсулы, жидкости, гели, сиропы, взвеси, суспензии и подобные. Активный ингредиент может быть составлен для парентерального введения путем инъекции, такой как болюсная инъекция или непрерывная инфузия. Такие композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Другие фармакологические эксципиенты известны в данной области техники.

Другие системы доставки могут включать системы доставки с задержкой по времени, отсроченным высвобождением или пролонгированным высвобождением. Такие системы позволяют избежать повторного введения композиций по изобретению, описанных выше, повышая удобство для субъекта и врача. Многие типы систем доставки с высвобождением доступны и известны специалистам в данной области техники. Они включают системы на основе полимеров, таких как поли(лактидгликолид), сополиоксалаты, поликапролактоны, полиэфирамиды, полиортоэфиры, полигидроксимасляная кислота и полиангидриды. Микрокапсулы вышеуказанных полимеров, содержащие лекарственные средства, описаны, например, в патенте США № 5,075,109. Системы доставки также включают неполимерные системы, такие как липиды, включая стерины, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и жирные кислоты, или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; системы выпуска гидрогеля; силастиковые системы; системы на основе пептидов; восковые покрытия; прессованные таблетки с использованием обычных связующих веществ и наполнителей; частично слитые имплантаты; и подобные. Конкретные примеры включают, но не ограничены ими: (а) эрозионные системы, в которых, по меньшей мере, один С-концевой полипептид эндостатина или полинуклеотид, кодирующий пептид, содержится в форме в матрице, такие как описаны в патентах США № № 4,452,775; 4,667,014; 4,748,034; 5,239,660; и 6,218,371 и (b) диффузионные системы, в которых активный компонент проникает с контролируемой скоростью из полимера, как описано в патентах США №№ 3,832,253 и 3,854,480. Кроме того, могут использоваться аппаратные системы доставки на основе насосов, некоторые из которых адаптированы для имплантации.

Использование имплантата длительного действия с замедленным высвобождением может быть особенно подходящим для лечения хронических состояний, таких как склеродермия. Долгосрочное высвобождение, используемое в настоящем документе, означает, что имплантат сконструирован и приспособлен для доставки терапевтических уровней активного ингредиента в течение, по меньшей мере, 30 дней, и предпочтительно, 60 дней. Имплантаты длительного действия с замедленным высвобождением хорошо известны специалистам в данной области техники и включают некоторые из описанных выше систем высвобождения. Эти системы были описаны для использования с олигодезоксинуклеотидами (см. патент США № 6,218,371). Для применения *in vivo*

нуклеиновые кислоты и пептиды предпочтительно относительно устойчивы к деградации (например, под действием эндо- и экзонуклеаз). Таким образом, можно использовать модификации, такие как включение С-концевого амида.

Терапевтически эффективное количество антитела будет зависеть от используемого антитела, субъекта, которого лечат, тяжести и типа заболевания и способа введения. Например, терапевтически эффективное количество антитела может варьироваться от примерно 0,01 мкг на килограмм (кг) массы тела до примерно 1 г на кг массы тела, например, от примерно 1 мкг до примерно 5 мг на кг массы тела, или от примерно 5 мкг до примерно 1 мг на кг массы тела. Точная доза легко определяется специалистом в данной области техники на основе активности конкретного соединения, возраста, веса, пола и физиологического состояния субъекта.

Однократное или многократное введение композиций осуществляют в зависимости от дозировки и частоты, которые требуются и переносятся субъектом. В одном варианте осуществления, дозу вводят однократно в виде болюса, и в другом варианте осуществления, может применяться периодически до достижения терапевтического результата. Как правило, доза достаточна для лечения или облегчения симптомов или признаков заболевания, не вызывая неприемлемой токсичности у субъекта. Можно использовать системное или местное введение.

В другом способе, вводят дополнительный агент. В одном примере, это введение является последовательным. В других примерах, дополнительный агент вводят одновременно с антителом.

Для лечения склеродермии, примеры дополнительных агентов, которые можно использовать с антителом, включают нифедипин, амлодипин, дилтиазем, фелодипин или никардипин. Исследуемый препарат Gleevec также используется для лечения склеродермии. Gleevec или другие ингибиторы тирозинкиназы можно использовать с описанными в настоящем документе антителами. Пациентам с поражением легких при склеродермии помогает оксигенотерапия; С-концевые полипептиды эндостатина, описанные в настоящем документе, можно вводить вместе с этой терапией.

Для лечения фиброза кожи и склеродермии дополнительно применяют d-пеницилламин, колхицин, релаксин, стероиды и циклоспорин. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный агент представляет собой SAR100842 (см. Allano et al., *Arthr. Rheum.* 70(10):1634-1643 (2018)). С-концевые

полипептиды эндостатина также можно использовать в комбинации с иммунодепрессантами. Кроме того, антитела можно использовать с метотрексатом, циклофосфамидом, азатиоприном, микофенолатом, глитазонами, антагонистами эндотелиновых рецепторов или фулвестрантом (ICI-182,780).

Описание иллюстрируется следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Разработка моноклональных антител

Моноклональные антитела к IGFBP5 обнаруживают из наивных библиотек фагового дисплея человека. Сначала из библиотеки удаляют неспецифические или перекрестно-реактивные антитела-фаги. С этой целью, библиотеку инкубируют в присутствии: а) стрептавидиновых микроносителей и BSA или б) стрептавидиновых микроносителей и BSA, IGFBP1 (R&D, кат. № 871-B1), IGFBP2 (R&D, кат. № 674-B2), IGFBP 3 (R&D, кат. № 675-B3), IGFBP4 (R&D, кат. № 804-GB) и IGFBP6 (R&D, кат. № 876-B6).

Антитело-фаг, которое связывается с отрицательными антигенами, исключают из дальнейшего отбора. После этого, очищенную библиотеку отбирают для антигенспецифических антител-мишеней. Первый, биотинилированный IGFBP5 (R&D, человек: кат. № 875-B5, мышь: кат. № 578-B5) добавляют в присутствии отрицательных антигенов к препаратам библиотеки а) и б). Антитела-фаги, которые связываются с биотинилированным антигеном-мишенью, захватывают и извлекают из раствора с использованием магнитных стрептавидиновых микроносителей. Микроносители несколько раз промывают раствором BSA (содержащим 0,05% Tween20) и BSA для удаления неспецифических или слабосвязанных частиц антитело-фаг. Фаг антигенспецифического антитела элюируют из микроносителей обработкой трипсином и освобождают от инфекции *E. coli*. После непродолжительного размножения, бактерии коинфицируют хелперным фагом M13K07 и индуцируют амплификацию антитело-фаг. Амплифицированный фаг используют еще для двух циклов селекции, как описано выше. Обзор стратегий отбора антител представлен в таблице 1:

Таблица 1: Обзор стратегии выбора антитела			
Отрицательный отбор в цикле отбора 1-3	Положительный отбор в цикле отбора 1	Положительный отбор в цикле отбора 2	Положительный отбор в цикле отбора 3
а) Стрептавидин-микроносители, BSA	IGFBP5 человека	IGFBP5 человека	IGFBP5 человека или IGFBP5 мыши

b) Стрептавидин-микроносители, BSA, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP6	IGFBP5 человека	IGFBP5 человека	IGFBP5 человека или IGFBP5 мыши
--	-----------------	-----------------	---------------------------------

В конце процесса обнаружения, каждый результат селекции подвергают скринингу на антиген-специфические антитела и анализируют характеристики связывания клонов моноклональных антител. С этой целью, для продуцирования антител scFv используют 3072 одиночных колоний. Затем их тестируют на специфическое связывание антигена с помощью ELISA на стрептавидине + биотинилированном IGFBP5 человека, стрептавидине + биотинилированном IGFBP5 мыши, стрептавидине и BSA, и 842 клон показывают перекрестное реактивное связывание между IGFBP5 человека и мыши с отношением S/N >10. 192 из этих ELISA-положительных клонов отбирают для вторичного скрининга. Для этой цели, получают вторую партию scFv, которую тестируют на более широкой панели антигенов: стрептавидин + биотинилированный IGFBP5 человека, стрептавидин + биотинилированный IGFBP5 мыши, стрептавидин, BSA, IGFBP1 человека, IGFBP2 человека, IGFBP3 человека, IGFBP4 человека, IGFBP5 человека и IGFBP6 человека.

Идентифицируют 17 ведущих клонов антител, которые демонстрируют связывание с захваченным стрептавидином и непосредственно иммобилизованным IGFBP5 человека и мыши. Связывание с IGFBP1 человека, IGFBP2 человека, IGFBP3 человека, IGFBP4 человека и IGFBP6 человека не было обнаружено.

Анализ последовательности ДНК 17 ведущих клонов антител выявил наличие 15 кандидатов с уникальной последовательностью антител (> 1 аминокислотное отличие в CDR). Последовательность ДНК scFv амплифицируют с помощью ПЦР и клонируют в вектор экспрессии scFv-Fc млекопитающих YUMAB, что приводит к генетическому слиянию scFv с Fc IgG4 человека. Бактериальные клоны с правильно клонированным геном scFv используют для выделения трансфекционной ДНК. ДНК используют для временной трансфекции клеток НЕК, которые продуцируют и секретируют антитело в культуральную среду. Антитела очищают аффинной хроматографией (белок А) и повторно буферизируют в PBS. Концентрацию белка определяют с помощью УФ/видимой спектроскопии, и чистоту проверяли окрашиванием Coomassie. 13 из 15 антител могут быть успешно получены в формате scFv-Fc.

Последовательности 15 новых анти-IGFBP5 антител представлены в таблицах 2-8.

Таблица 2: VH CDR Последовательности типовых антител (определения Kabat)			
Антитело	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
A09	SYGIS (SEQ ID No. 1)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID No. 6)	EWELLGGLDY (SEQ ID No. 12)
B06	SYAMS (SEQ ID No. 2)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID No. 7)	GAGTLDY (SEQ ID No. 13)
C02	SYGIS (SEQ ID No. 1)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID No. 6)	GRGVIDY (SEQ ID No. 14)
D10	SYGIS (SEQ ID No. 1)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID No. 6)	DRYLGWFDP (SEQ ID No. 15)
F05	SYGIS (SEQ ID No. 1)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID No. 6)	GRGSFDP (SEQ ID No. 16)
B09	SYGIS (SEQ ID No. 1)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID No. 6)	DLAVGTHGDY (SEQ ID No. 17)
B11	SYAIS (SEQ ID No. 3)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID No. 8)	NVRLPGWFDP (SEQ ID No. 18)
C11	SYGMH (SEQ ID No. 4)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID No. 9)	GDYSDTSGTDFQFH (SEQ ID No. 19)
C12	SYAIS (SEQ ID No. 3)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID No. 8)	LGRELSFDY (SEQ ID No. 20)
D12	SYAIS (SEQ ID No. 3)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID No. 8)	FGRPQLGYAFDI (SEQ ID No. 21)
E02	SYAIS (SEQ ID No. 3)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID No. 8)	MSVAGPSISFDY (SEQ ID No. 22)
E03	SYAIS (SEQ ID No. 3)	GITPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID No. 10)	AGILTYGYFDY (SEQ ID No. 23)
E05	GYGMN (SEQ ID No. 5)	YVGSSSSTIYYADSVKG (SEQ ID No. 11)	GLGGN (SEQ ID No. 24)
F04	SYGMH (SEQ ID No. 4)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID No. 9)	LSGPNGVDY (SEQ ID No. 25)
G01	SYAIS (SEQ ID No. 3)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID No. 8)	ITEGAFDY (SEQ ID No. 26)

Таблица 3: VL CDR последовательности типовых антител (определения Kabat)			
Антитело	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
A09	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID No. 27)	EVSNRPS (SEQ ID No. 37)	SSYTSSSTVV (SEQ ID No. 48)
B06	KSSQSVLYSSNNKNYLS (SEQ ID No. 28)	WASTRES (SEQ ID No. 38)	QQYYSTPLT (SEQ ID No. 49)
C02	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID No. 29)	WASTRES (SEQ ID No. 38)	QQYYSTPLT (SEQ ID No. 49)

Таблица 3: VL CDR последовательности типовых антител (определения Kabat)			
Антитело	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
D10	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID No. 27)	EVSNRPS (SEQ ID No. 39)	SSYTSSSTPYV (SEQ ID No. 50)
F05	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID No. 29)	WASTRES (SEQ ID No. 38)	QYYSTPLT (SEQ ID No. 49)
B09	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID No. 27)	EVSNRPS (SEQ ID No. 39)	SSYTSSSTLEV (SEQ ID No. 51)
B11	RASQSISSWLA (SEQ ID No. 30)	KASSLES (SEQ ID No. 40)	QQYNSYPLT (SEQ ID No. 52)
C11	RASQSISSYLN (SEQ ID No. 31)	AASSLQS (SEQ ID No. 41)	QQSYSTPG (SEQ ID No. 53)
C12	RASQSISSYLN (SEQ ID No. 31)	AASSLQS (SEQ ID No. 41)	QQSYSESWT (SEQ ID No. 54)
D12	RASQSLADYLA (SEQ ID No. 32)	GASTRAT (SEQ ID No. 42)	QQNDNWPYT (SEQ ID No. 55)
E02	RASQSISSYLN (SEQ ID No. 31)	AASSLQR (SEQ ID No. 43)	QETYSNLWT (SEQ ID No. 56)
E03	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID No. 33)	EDNQRPS (SEQ ID No. 44)	QSYDSSNRPWV (SEQ ID No. 57)
E05	SGSRSNIGSNYVH (SEQ ID No. 34)	RNDQRPS (SEQ ID No. 45)	AAWDDGLSVL (SEQ ID No. 58)
F04	QGDSVRKYTN (SEQ ID No. 35)	GKNYRPS (SEQ ID No. 46)	HSRDTSDIHLNV (SEQ ID No. 59)
G01	RASRTVGSWLA (SEQ ID No. 36)	DASNLQS (SEQ ID No. 47)	QQYNSSPYT (SEQ ID No. 60)

Таблица 4: VH аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	AK VH
A09	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQ KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREWELLGGLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID No. 61)
B06	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAGTLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID No. 62)
C02	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQ KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGRGVIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID No. 63)
D10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQ KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRYLGWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID No. 64)
F05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQ KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGRGSDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID No. 65)

Таблица 4: VH аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	AK VH
B09	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQ KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLAVGTHGDYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID No. 66)
B11	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNVRLPGWFDPPWGQGTLLTVVSS (SEQ ID No. 67)
C11	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYS DTS G T D F F Q H W G Q G T Q V T V S S (SEQ ID No. 68)
C12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCATL GRELSFDYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID No. 69)
D12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFGRPQLGYAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID No. 70)
E02	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCATMSVAGPSISFDYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID No. 71)
E03	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGITPIFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAGILTGYFDYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID No. 72)
E05	EVQLVESGGGLVQP G G S L K L S C A A S G F T F S S Y G M N W V R Q A P G K G L E W W S Y V G S S S T I Y Y A D SVKGRFTISRDNANNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLGGNWGQGTMTVTVSS (SEQ ID No. 73)
F04	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLSPNGVDYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID No. 74)
G01	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASITEGAFDYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID No. 75)

Таблица 5: VL аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	AK VL
A09	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSSTVVF G G G T K L T V L (SEQ ID No. 76)
B06	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLSWYQQKPGQP K L L I Y W A S T R E S G VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID No. 77)
C02	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQP K L L I Y W A S T R E S G VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGGGTKVDIK (SEQ ID No. 78)

Таблица 5: VL аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	AK VL
D10	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTPYVFGTGKLTVL (SEQ ID No. 79)
F05	DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQQYYSTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID No. 80)
B09	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLEVVFSGGKLTVL (SEQ ID No. 81)
B11	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFS SGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID No. 82)
C11	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPGFGGGTKVEIK (SEQ ID No. 83)
C12	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSESWTFGQGTVDIK (SEQ ID No. 84)
D12	ETTLTQSPGTLSPGDRATLSCRASQSLADYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF SGSGSGTEFTLTVSSLQSEDFAVYYCQQNDNWPTYFGQGTKLEIK (SEQ ID No. 85)
E02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVAIPCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQETYSNLWTFGQGTKVEIK (SEQ ID No. 86)
E03	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPSSPTTVIYEDNQRPSGVPDR FSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNRPWFSGGKLTVL (SEQ ID No. 87)
E05	QPGLTQPPSASGAPGQRVTISCSGSRNIGSNYVHWYQQLPGTAPKLLIYRNDQRPSGVPAR FSASKGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDGLSVLFGGGTKLTVL (SEQ ID No. 88)
F04	SSELTQDPSPSVSVALGQTVTITCQGDSVRKYYTNWYQQKPGQAPILVLYGKNYRPSGIPDRFSG STSGDTAYLTITGAQAEDAADYYCHSRDTSIHNLNVFGTGKVTVL (SEQ ID No. 89)
G01	AIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASRTVGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFS SGSGSGTEFTLTISSLQPDLLSTYYCQQYNSSPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID No. 90)

Определения CDR также представлены с использованием инструмента аннотации с <http://www.abysis.org/> на основе полных аминокислотных последовательностей VH и VL, как определено в таблицах 4 и 5.

Например, аминокислотная последовательность VH или VL любого описанного в настоящем документе антитела вставляется в инструмент для

аннотации, и предоставляются последовательности CDR, определенные Kabat, или последовательности CDR, определенные IMGT, или Chothia, или AbM, или Contact. С помощью функции «Все рядом» предоставляются определенные последовательности CDR.

В таблице 4.1 показаны такие последовательности, относящиеся к VH и VL B06.

Таблица 4.1. B-06 CDR VH и VL в соответствии с различными определениями, отсортированные путем вставки последовательности VH (SEQ ID No. 62) и VL (SEQ ID No. 77) в инструмент аннотации www.abysis.org.

V_H				
Область	Определение	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина
CDR-H1	Chothia	GFTFSSY---	26 - 32	7
	AbM	GFTFSSYAMS	26 - 35	10
	Kabat	----SYAMS	31 - 35	5
	Contact	----SSYAMS	30 - 35	6
	IMGT	GFTFSSYA--	26 - 33	8
CDR-H2	Chothia	----SGSGGS-----	52 - 57	6
	AbM	---AISGSGGSTY-----	50 - 59	10
	Kabat	---AISGSGGSTYYADSVKG	50 - 66	17
	Contact	WWSAISGSGGSTY-----	47 - 59	13
	IMGT	----ISGSGGST-----	51 - 58	8
CDR-H3	Chothia	--GAGTLDY	99 - 105	7
	AbM	--GAGTLDY	99 - 105	7
	Kabat	--GAGTLDY	99 - 105	7
	Contact	ARGAGTLD-	97 - 104	8
	IMGT	ARGAGTLDY	97 - 105	9
V_L				
Область	Определение	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина
CDR-L1	Chothia	KSSQSVLYSSNNKNYLS--	24 - 40	17
	AbM	KSSQSVLYSSNNKNYLS--	24 - 40	17
	Kabat	KSSQSVLYSSNNKNYLS--	24 - 40	17
	Contact	-----LYSSNNKNYLSWY	30 - 42	13
	IMGT	---QSVLYSSNNKNY----	27 - 38	12
CDR-L2	Chothia	---WASTRES	56 - 62	7
	AbM	---WASTRES	56 - 62	7
	Kabat	---WASTRES	56 - 62	7
	Contact	LLIYWASTRE-	52 - 61	10
	IMGT	---WA-----	56 - 57	2
CDR-L3	Chothia	QQYYSTPLT	95 - 103	9
	AbM	QQYYSTPLT	95 - 103	9
	Kabat	QQYYSTPLT	95 - 103	9
	Contact	QQYYSTPL-	95 - 102	8
	IMGT	QQYYSTPLT	95 - 103	9

В таблице 5.1 показаны такие последовательности, относящиеся к VH и VL

B09.

Таблица 5.1 CDR VH и VL B-09 в соответствии с различными определениями, отсортированные путем вставки последовательности VH (SEQ ID No. 66) и VL (SEQ ID No. 81) в инструмент аннотации www.abysis.org.

V_H

Область	Определение	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина
CDR-H1	Chothia	GYTFTSY---	26 - 32	7
	AbM	GYTFTSYGIS	26 - 35	10
	Kabat	-----SYGIS	31 - 35	5
	Contact	----TSYGIS	30 - 35	6
	IMGT	GYTFTSYG--	26 - 33	8
CDR-H2	Chothia	-----SAYNGN-----	52 - 57	6
	AbM	--WISAYNGNTN-----	50 - 59	10
	Kabat	--WISAYNGNTNYAQKLQG	50 - 66	17
	Contact	WMGWISAYNGNTN-----	47 - 59	13
	IMGT	----ISAYNGNT-----	51 - 58	8
CDR-H3	Chothia	--DLAVGTHGDY	99 - 108	10
	AbM	--DLAVGTHGDY	99 - 108	10
	Kabat	--DLAVGTHGDY	99 - 108	10
	Contact	ARDLAVGTHGD-	97 - 107	11
	IMGT	ARDLAVGTHGDY	97 - 108	12

V_L

Область	Определение	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина
CDR-L1	Chothia	TGTSSDVGGYNYVS--	23 - 36	14
	AbM	TGTSSDVGGYNYVS--	23 - 36	14
	Kabat	TGTSSDVGGYNYVS--	23 - 36	14
	Contact	-----VGGYNYVSWY	29 - 38	10
	IMGT	---SSDVGGYNY----	26 - 34	9
CDR-L2	Chothia	----EVSNRPS	52 - 58	7
	AbM	----EVSNRPS	52 - 58	7
	Kabat	----EVSNRPS	52 - 58	7
	Contact	LMIYEVSNRP-	48 - 57	10
	IMGT	----EV-----	52 - 53	2
CDR-L3	Chothia	SSYTSSSTLEV	91 - 102	12
	AbM	SSYTSSSTLEV	91 - 102	12
	Kabat	SSYTSSSTLEV	91 - 102	12
	Contact	SSYTSSSTLEV-	91 - 101	11
	IMGT	SSYTSSSTLEV	91 - 102	12

Таблица 6: VH нуклеотидные последовательности типовых антител

Антитело	ДНК VH
A09	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGC ACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGAAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTGGGAG CTACTTGGGGGGCTTGA TACTG TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 91)
B06	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTC CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGGGGGGCTGG TACGCTTGACTACTG TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 92)
C02	CAGGTTGAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGC ACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGTGCGGGA GTTATAGACTACTG TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 93)
D10	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGC ACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGATATT TGGGGTGGTTCGACCCCTG TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 94)
F05	CAGGTTGAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGC ACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGTAGAGGT AGTTTCGACCCCTG TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 95)
B09	CAGGTGTAGCTGGTGCATCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGC ACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTTACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTGGCA GTTGGGACCCACGGTGACTACTG TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 96)

Таблица 6: VH нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	ДНК VH
B11	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAACGTCCGT CTCCCAGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 97)
C11	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACAGCTGTATACTACTGTGCGAGAGGGGACTAT TCTGATACCAGTGGTACCGATTCTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTCACCGTGT CCTCA (SEQ ID No. 98)
C12	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACCCTCGGGAGG GAGCTCAGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 99)
D12	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTCTGGAAGG CCGCAGCTGGGCTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTGTCTTCA (SEQ ID No. 100)
E02	CAAATGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAATGTCAAGTGG CTGGTCCTTCAATATCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 101)
E03	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCACCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCGGGAATT TTGACTGGTTATTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA (SEQ ID No. 102)

Таблица 6: VH нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	ДНК VH
E05	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGGCTATGGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTC CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACGTTGGTAGTAGTAGTACCATATACTACGC AGATTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAACAACACTCACTGTATCTGC AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCCTCGGTG GTAATTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTGTCTTCA (SEQ ID No. 103)
F04	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAACTACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAACTTTCCGGG CCCAACGGTGTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTTCA (SEQ ID No. 104)
G01	CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACACTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGCATTACGGAG GGGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTTCA (SEQ ID No. 105)

Таблица 7: VL нуклеотидные последовательности	
Антитело	ДНК VL
A09	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCT CCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCA CCCAGGCAAAAGCCCCCAAACATGATTTATGAGGTCAAGTATCGGCCCTCAGGGGTTTCT AATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG CTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACTGTGGTATTCCG CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTA (SEQ ID No. 106)
B06	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTATCTTGG TACCAGCAGAAACCAGGTACGCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCCGGGAAT CCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAATCAAA (SEQ ID No. 107)
C02	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTG GTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCCGGGAA TCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCGCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAA (SEQ ID No. 108)

Таблица 7: VL нуклеотидные последовательности	
Антитело	ДНК VL
D10	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCT CCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCA CCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCATGATTTATGAGGTCAAGTAAATCGGCCCTCAGGGGTTTCT AATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG CTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACCCCTTATGTCTTC GGAAGTGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID No. 109)
F05	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTG GTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAA TCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGGCCGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCTCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID No. 110)
B09	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCT CCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCA CCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCATGATTTATGAGGTCAAGTAAATCGGCCCTCAGGGGTTTCT AATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG CTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATACACAAGCAGCAGCACTCTCGAGGTGGT ATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID No. 111)
B11	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA TCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGG TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATG ATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID No. 112)
C11	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA TCACTTGCCGGGCCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCAGGGTTTCGGCGGAGGGACCAA GGTGGAGATCAAA (SEQ ID No. 113)
C12	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT CACTTGCCGGGCCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGAT TTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTGAGTCGTGGACGTTTCGGCCAGGGGACCA CGGTGGACATCAAA (SEQ ID No. 114)
D12	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGATAGAGCCACCC TCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTAGCGCCGACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACC TGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACAAGGGCCACTGGTATCCCAGCC AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCCTCAGCAGCCTGCAGTCTG AAGATTTTGCAAGTTTATTACTGTCAGCAGAATGATAACTGGCCGTACACTTTTGCCAGGGG ACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID No. 115)

Таблица 7: VL нуклеотидные последовательности	
Антитело	ДНК VL
E02	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCCGCATCTGTGGGAGACAGAGTCGCCA TCCCTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTACTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAACTGCTGATCTACGCTGCATCCAGTTTGCAAAGAGGGGTCCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTATTGTCAAGAGACTTACAGTAACCTGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACC AAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID No. 116)
E03	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCTGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCATCT CCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCC CGGGCAGTTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGA TCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGA AGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCACTCTTATGATAGCAGCAATCGGCCTTGGGT GTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID No. 117)
E05	CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGGCCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC TCTTGTCTGGAAGCAGGTCCAATATCGGTTCTAATTATGTACACTGGTACCAACAACCTCCC AGGAACGGCCCCCAAACCTCATCTTTATAGGAATGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGCC CGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCG AGGATGAAGCTGATTACTACTGTGCAGCGTGGGATGACGGAAGTGTCTTATTCGGCGG AGGGACCAAGTTGACCGTCCTA (SEQ ID No. 118)
F04	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAAACAGTCACTATCAC GTGCCAAGGAGACAGTGTGAGAAAGTATTATACGAAGTGGTATCAACAGAAGCCAGGACAG GCCCCATCCTTGTCTCTATGGTAAAACTACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTC TGGCTCCACGTCCGGAGACACAGCGTACTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAGGATGC GGCAGACTATTATTGTCACTCCCGGGACACCAGTGATATCCATCTAAATGTCTTCGGCACTG GGACCAAGGTCACCGTCCTA (SEQ ID No. 119)
G01	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA TCACTTGCCGGGCCAGTCGGACTGTTGGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAG GTTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAT GATTTGTCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTCCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGAC CAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID No. 120)

Таблица 8: Аминокислотные последовательности константной области	
Константная область	АК
Тяжелая цепь IgG4 человека P01861.1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID No. 121)

Таблица 8: Аминокислотные последовательности константной области	
Константная область	АК
Тяжелая цепь IgG2 человека P01859	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP PCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No. 122)
Легкая цепь лямбда 1 человека P0CG04	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVET TKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID No. 123)
Легкая цепь лямбда 2 человека P0DOY2	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID No. 124)
Легкая цепь каппа человека P01834	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID No. 125)

Способ экспрессии рекомбинантного белка в клетках CHO

Соответствующие кДНК B06 и B09 клонируют в векторную систему evitria с использованием обычных (не основанных на ПЦР) методов клонирования. Синтезируют гены векторных плазмид evitria. Плазмидную ДНК получают в условиях низкого содержания эндотоксинов на основе анионообменной хроматографии. Правильность последовательностей была проверена с помощью секвенирования по Сэнгеру (до двух реакций секвенирования на плазмиду в зависимости от размера кДНК).

Адаптированные к суспензии клетки CHO K1 (evitria) используют для продуцирования. Культуру для посева выращивают в среде eviGrow, среде определенного химического состава, не содержащей компонентов животного происхождения и не содержащей сыворотки. Клетки трансфицируют с помощью eviFect, запатентованного реагента для трансфекции, сделанного по заказу для evitria, и после трансфекции клетки выращивают в среде eviMake, не содержащей животных компонентов и сыворотки, при 37°C и 5% CO₂ в течение 7 дней. Супернатант собирают центрифугированием и последующей фильтрацией (фильтр 0,2 мкм).

Антитело очищают с использованием MabSelect™ SuRe™ с PBS по Дульбекко (Lonza BE17-512Q) в качестве промывочного буфера, и 0,1 М глицина, pH 3,5, в качестве элюирующего буфера. Последующую эксклюзионную

хроматографию проводят на колонке HiLoad Superdex 200 пг с использованием конечного буфера в качестве рабочего буфера.

Мономерность определяют с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Agilent AdvanceBio SEC (300A 2,7 мкм 7,8 x 300 мм) и DPBS в качестве рабочего буфера со скоростью 0,8 мл/мин.

Пример 2. Измерение аффинности

Анализ на основе Octet BLI

Для более подробной оценки аффинности связывания, измерения аффинности выполняют с использованием анализа биомолекулярного взаимодействия, выполняемого платформой Octet (система BLItz), которая представляет собой платформу интерферометрии биослоев (BLI). Чтобы провести анализ, целевое моноклональное антитело (mAb, 2 идентичных антигенсвязывающих группы, 2 мкг/мл в 1% BSA, содержащей 0,05% Tween 20) иммобилизуют через Fc на биосенсоре АНС и измеряют взаимодействие с антигеном IGFBP5 человека (R&D, кат. № 875-B5) и IGFBP5 мыши (R&D, кат. № 578-B5) в различных концентрациях.

Результаты измерения аффинности полноразмерных mAb B06 и B09 к целевому IGFBP5 человека и мыши представлены в таблице 9.

Таблица 9: Аффинность B06 и B09 к целевому IGFBP5 человека и мыши		
Идентификатор молекулы	B06	B09
hIGFBP-5 КД (М)	1×10^{-10}	1×10^{-10}
miIGFBP-5 КД (М)	1×10^{-10}	1×10^{-10}

Только что созданные анти-IGFBP5 mAb демонстрируют хорошую аффинность связывания антигена человека с KD ниже 4×10^{-10} М. Антитела также проявляют мышиную перекрестную реактивность. Эти данные подтверждают, что мышей можно считать подходящим видом животных для тестирования моноклональных антител во время доклинической разработки.

Пример 3: Первичный клеточный анализ, релевантный к фиброзу (IPF)

Фиброз представляет собой процесс непрерывного восстановления тканей, характеризующийся образованием и отложением фибриллярного богатого коллагеном внеклеточного матрикса (ECM), что приводит к прогрессирующему ремоделированию в большинстве тканей и органов. Формирование фиброзной рубцовой ткани необходимо для восстановления и поддержания целостности тканей и органов во время заживления ран после травмы. Однако, когда

механизмы рубцевания обостряются после повторяющихся травм, хронический фиброгенез приводит к переходу от поддерживающей фиброзной ткани к рубцовой ткани. Это совпадает с увеличением количества и активности клеток, продуцирующих внеклеточный матрикс, что в конечном итоге приводит к разрушению нормальной архитектуры и функции тканей/органов.

В легких, например, при идиопатическом легочном фиброзе (IPF), происходит рубцевание/фиброз тканей. За повреждением тканей следует активация иммунной системы, которая вызывает высвобождение нескольких цитокинов и факторов роста, включая трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF β -1), который сигнализирует ткани восстанавливаться. Механически, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) является одним из основных факторов фиброза, и приблизительно 30% ECM-продуцирующих (мио-) фибробластов происходят из эпителиальных клеток посредством EMT. Во время EMT, плотно организованные эпителиальные клетки теряют экспрессию маркера плотного контакта E-кадгерина и трансформируются в мезенхимальные клетки с экспрессией маркеров мезенхимальных клеток N-кадгерина, виментина и фибронектина. Кроме того, клетки приобретают миграционный потенциал, что позволяет им мигрировать по всей ткани. Другим важным механизмом во время фиброза является трансформация фибробластов в миофибробласты (FMT), когда происходящие из EMT, резидентные и инвазивные фибробластоидные клетки активируются (*например*, с помощью TGF β -1) и начинают дифференцироваться в сторону миофибробластов. Миофибробласты представляют собой гетерогенную популяцию, происходящую от разных предшественников, и характеризуются образованием альфа-актина гладких мышц мускулатуры (α SMA), содержащего стрессовые волокна, а также экспрессией и секрецией фибриллярного коллагена, фибронектина и дополнительных компонентов ECM. Повышенное продуцирование и накопление ECM приводит к необратимому повреждению фиброзной ткани с aberrантной архитектурой, неспособной функционировать должным образом.

In vitro анализы FMT и EMT являются признанными моделями для выявления и характеристики антифибротических соединений (см. Weigle et al. J Biol Methods (2019) Vol. 6(2)).

Анализ перехода фибробластов в миофибробласты (FMT)

Бронхиальные фибробласты легких человека, полученные от трех пациентов с IPF, высевает в 384-луночные планшеты (кат. 6057302, Perkin Elmer)

с плотностью 750 клеток/лунку в 2% FBS-DMEM (DMEM с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки (кат. 10100-147, Gibco) и 1% пенициллин и стрептомицин (кат. 15140, Gibco)). Через два дня после посева клетки обновляют 2% FBS-DMEM. Через пять дней после посева клетки обновляют 0,2% FBS-DMEM (DMEM с добавлением 0,2% эмбриональной бычьей сыворотки (кат. 10100-147, Gibco) и 1% пенициллина и стрептомицина (кат. 15140, Gibco)) и анти-IGFBP5 mAb (B06 и B09) добавляют в восьмиступенчатую кривую ответа на концентрацию с использованием шагов разведения 0,5 LogM с максимальной концентрацией 1,1 мкМ для B06 и 1,5 мкМ для B09. Для оценки анализа эффективности, используют ингибитор ALK5 (SB525334; кат. № S8822-25, Sigma при 1 мкМ в 0,1% ДМСО (положительный контроль), 0,1% ДМСО (контроль носителя 1; кат. № D8418, Sigma) и 3.6% PBS (контроль носителя 2). Через один час после добавления анти-IGFBP5 mAb (B06 и B09), ДМСО или PBS, клетки активируют 1,25 нг/мл TGF- β 1 (кат. № 240-B-010, R&D Systems) для индукции перехода фибробластов к миофибробластам (FMT). Через три (3) дня после добавления TGF- β 1, клетки фиксируют 4% формальдегидом (кат. № 8187081000, Merck) и окрашивают на α -актин гладких мышц (α SMA) в качестве маркера миофибробластов и ядер (DAPI). Для определения экспрессии α SMA, фиксированные фибробласты легких инкубируют в блокирующем буфере (PBS, содержащем 5 мг/мл BSA (кат. № A2153, Sigma) и 0,2% (об./об.) Triton X-100 (кат. № T8787, Sigma)) в течение одного часа при комнатной температуре. Затем клетки инкубируют с моноклональным анти- α SMA антителом, конъюгированным с Alexa Fluor 488 (1 мкг/мл; кат. № AB184675, Abcam), в течение одного часа при комнатной температуре, промывают PBS и инкубируют с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, 0,5 мкг /мл; кат. № D3571, Life Technologies) и визуализируют на In Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare). Экспрессию количественно определяют с использованием программного обеспечения для разработчиков IN Cell (GE Healthcare). Экспрессия α SMA представлена как интенсивность окрашивания, умноженная на окрашенную площадь (уровни DxА). Совместное окрашивание ядер клеток с DAPI проводят для количественного определения числа клеток в качестве меры потенциальной цитотоксичности.

После анализа, анти-IGFBP5 mAb показывают зависимое от концентрации ингибирование опосредованной TGF- β 1 экспрессии α SMA в образцах пациентов с IPF. Более того, анти-IGFBP5 mAb не показывают модуляцию числа ядер, что свидетельствует об отсутствии потенциальных цитотоксических побочных

эффектов (фигура 1).

Анализ эпителиально-мезенхимального перехода (EMT)

Клетки эпителия бронхов человека (HBEC), полученные от трех пациентов с IPF (IPF05, IPF06 и IPF07), высевают в 384-луночные планшеты (кат. № 6057302, Perkin Elmer) с плотностью 900 клеток/луночку в KSFM Complete (кератиноцитарная бессывороточная среда с добавлением 0,2 нг/мл эпидермального фактора роста, 25 мкг/мл экстракта гипофиза крупного рогатого скота (все из кат. 17005-075, Gibco), 1 мкмоль/л изопротеренола (кат. № I6504, Sigma) и 1% пенициллина и стрептомицина (кат. № 15140, Gibco)). Через два дня после посева клетки обновляют с помощью KSFM Complete. Через шесть дней после посева клетки обновляют с помощью KSFM Complete и анти-IGFBP5 mAb (B06 и B09) добавляют в восьмиступенчатую кривую концентрации-ответ с использованием стадий разведения 0,5 LogM с максимальной концентрацией 1,1 мкМ для B06 и 1,5 мкМ для B09. Ингибитор ALK5 (SB525334; кат. № S8822-25, Sigma) в концентрации 1 мкМ в 0,1% ДМСО (положительный контроль), 0,1% ДМСО (контроль носителя 1; кат. № D8418, Sigma) и 3,6% Limited) представляет собой PBS (контроль носителя 2) используют для оценки эффективности анализа. Через один час после добавления анти-IGFBP5 mAb (B06 и B09), ДМСО или PBS, клетки активируют 5 нг/мл TGF- β 1 (кат. № 240-B-010, R&D Systems) для индуцирования эпителиально-мезенхимального перехода. (EMT). Через три дня после добавления триггера, клетки фиксируют 4% формальдегидом (кат. № 8187081000, Merck) и окрашивают на фибронектин (FN1), маркер мезенхимальных клеток и ядер (DAPI). Для определения экспрессии FN1, фиксированные HBEC инкубируют в блокирующем буфере (PBS, содержащем 5 мг/мл BSA (кат. № A2153, Sigma) и 0,2% (об./об.) Triton X-100 (кат. № T8787, Sigma)) в течение одного часа при комнатной температуре. Затем клетки инкубируют с моноклональным анти-FN1 антителом (0,125 мкг/мл; кат. № 610001, Biohit Health) в течение одного часа при комнатной температуре, промывают 0,05% Tween-20 (кат. № P1379, Sigma) в PBS и инкубируют с антимышиным вторичным антителом осла, конъюгированным с Alexa Fluor 546 (4 мкг/мл; кат. № A10036, Life Technologies) в течение одного часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывают 0,05% Tween в PBS, инкубируют с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, 0,5 мкг/мл; кат. № D3571, Life Technologies) и визуализируют на In Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare).

Экспрессию количественно определяют с использованием программного обеспечения для разработчиков IN-Cell (GE Healthcare). Экспрессия FN1 представлена как интенсивность окрашивания, умноженная на окрашенную

площадь (уровни DxA). Совместное окрашивание ядер клеток с DAPI проводят для количественного определения числа клеток в качестве меры потенциальной цитотоксичности.

После анализа, анти-IGFBP5 mAb B06 демонстрирует зависимое от концентрации ингибирование опосредованной TGF- β 1 экспрессии FN1 в образцах пациентов с IPF доноров IPF05 и IPF06. Более того, все анти-IGFBP5 mAb не показывают модуляции числа ядер, что свидетельствует об отсутствии потенциальных цитотоксических побочных эффектов (фигура 2).

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Все публикации, патенты, заявки на патенты и другие документы, цитируемые в данной заявке, настоящим полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ были отдельно указаны как включенные посредством ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя были проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты осуществления, приведенное выше описание не является ограничивающим. Следует понимать, что могут быть сделаны различные изменения без отклонения от сущности и объема изобретения(й). Специалистам в данной области техники после ознакомления с этим описанием станут очевидны многие вариации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор IGFBP5 и/или, по меньшей мере, один из его рецепторов, отличающийся тем, что указанный ингибитор обладает противофиброзным действием и/или противофиброзной активностью.

2. Ингибитор IGFBP5 и/или, по меньшей мере, один из его рецепторов для применения при лечении и/или профилактике фиброза и/или фиброзного состояния.

3. Ингибитор по п. 1 или п.2, отличающийся тем, что указанный ингибитор выбран из группы, состоящей из:

- а) полипептида;
- б) полинуклеотида или полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид;
- в) вектора, содержащего или экспрессирующего указанный полинуклеотид;
- г) генетически сконструированной клетки-хозяина, экспрессирующей указанный полипептид или указанный полинуклеотид;
- е) малой молекулы;
- ф) пептида, белка, антитела, антисмыслового олигонуклеотида, микроРНК, антисмыслового вектора экспрессии или рекомбинантного вируса.

4. Ингибитор по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный ингибитор представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с IGFBP5 человека или, по меньшей мере, с одним из его рецепторов, где указанное выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают противофиброзным действием.

5. Ингибитор по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный ингибитор ингибирует, уменьшает или нейтрализует образование α SMA, индуцированное профибротическим медиатором, и/или ингибирует, снижает или нейтрализует активацию экспрессии FN1, индуцированную профибротическим медиатором.

6. Ингибитор по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный ингибитор представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с IGFBP5 человека и обладает противофиброзным действием.

7. Ингибитор по п. 6, содержащий:

а. переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

і. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности,

выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 и 5;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 и 26; и/или

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 и 36;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60.

8. Ингибитор по любому из пунктов 6 или 7, содержащий:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1; и

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 4.1.

9. Ингибитор по любому из пунктов 6-8, содержащий:

a. переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1; и

b. переменный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно, такой, как показано в таблице 5.1; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org), предпочтительно такой, как показано в таблице 5.1.

10. Ингибитор по любому из пунктов 6-9, содержащий:

а. последовательность варибельного домена тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 и 75 или

б. последовательность варибельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, и 90, или

с. варибельный домен тяжелой цепи (а) и варибельный домен легкой цепи (б).

11. Ингибитор по любому из пунктов 6-10, выбранный из группы, состоящей из: A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело B06 или B09.

12. Ингибитор по п. 11, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 VH, выбранные из таблицы 2, и CDR1, CDR2 и CDR3 VL выбранные из таблицы 3.

13. Ингибитор по любому из пунктов 6-12, имеющий константу аффинности ниже или равную 10^{-8} М для IGFBP5 человека.

14. Ингибитор по любому из пунктов 1-5, представляющий собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое:

(а) специфически связывается с эпитопом на IGFBP5, где указанный эпитоп представляет собой тот же или аналогичный эпитоп, что и эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(б) перекрестно конкурирует за связывание с моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(с) демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как любой из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G0, как определено в таблицах 2-8; или

(д) имеет одно или несколько биологических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной из, например, любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8 и; или

(е) имеет одно или несколько фармакокинетических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела,

выбранной, например, из любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8.

15. Ингибитор по п. 6, представляющий собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое:

(a) специфически связывается с эпитопом на IGFBP5, где указанный эпитоп представляет собой тот же или аналогичный эпитоп, что и эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(b) перекрестно конкурирует за связывание с моноклональным антителом A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8; или

(c) демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как любой из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G0, как определено в таблицах 2-8; или

(d) имеет одно или несколько биологических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекула антитела, выбранная из, например, любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8 и; или

(e) имеет одно или несколько фармакокинетических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной, например, из любого из A09, B06, C02, D10, F05, B09, B11, C11, C12, D12, E02, E03, E05, F04, G01, как определено в таблицах 2-8.

16. Ингибитор по любому из предшествующих пунктов, представляющий собой человеческое или гуманизированное антитело.

17. Ингибитор по любому из предшествующих пунктов, представляющий собой антитело IgG2 или IgG4, предпочтительно, каппа-антитело IgG2, лямбда-антитело IgG2, каппа-антитело IgG4 или лямбда-антитело IgG4.

18. Ингибитор по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный ингибитор снижает или ингибирует связывание IGFBP5, по меньшей мере, с одним из его рецепторов, предпочтительно, по меньшей мере, один рецептор представляет собой интегрин $\alpha 2\beta 1$ или интегрин $\alpha \nu \beta 6$.

19. Ингибитор по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный ингибитор i) снижает или ингибирует продуцирование внеклеточного матрикса, и/или ii) снижает или ингибирует отложение внеклеточного матрикса, и/или iii) снижает или ингибирует продуцирование коллагена и/или фибронектина

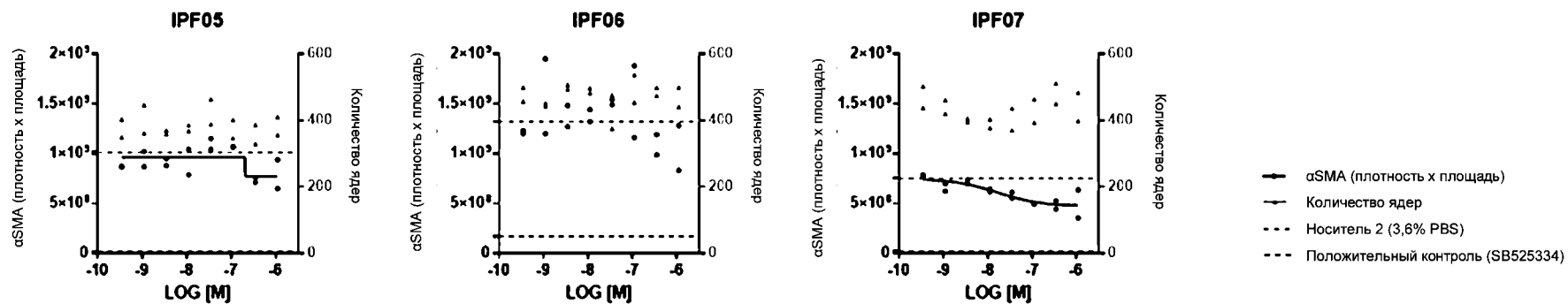
в первичных фибробластах легких, и/или iv) снижает или ингибирует отложение коллагена и/или фибронектина в первичных фибробластах легких.

20. Выделенный полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность, кодирующую ингибитор по любому из пунктов 4-18, предпочтительно, указанный полинуклеотид представляет собой кДНК или вектор, содержащий указанный выделенный полинуклеотид, предпочтительно указанный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, вирусного вектора, неэписомного вектора млекопитающего, вектора экспрессии и рекомбинантного вектора экспрессии или выделенной клетки, содержащей указанный выделенный полинуклеотид или указанный вектор, предпочтительно, указанная выделенная клетка представляет собой гибридому или клетку яичника китайского хомяка (CHO) или клетки почек эмбриона человека (HEK293).

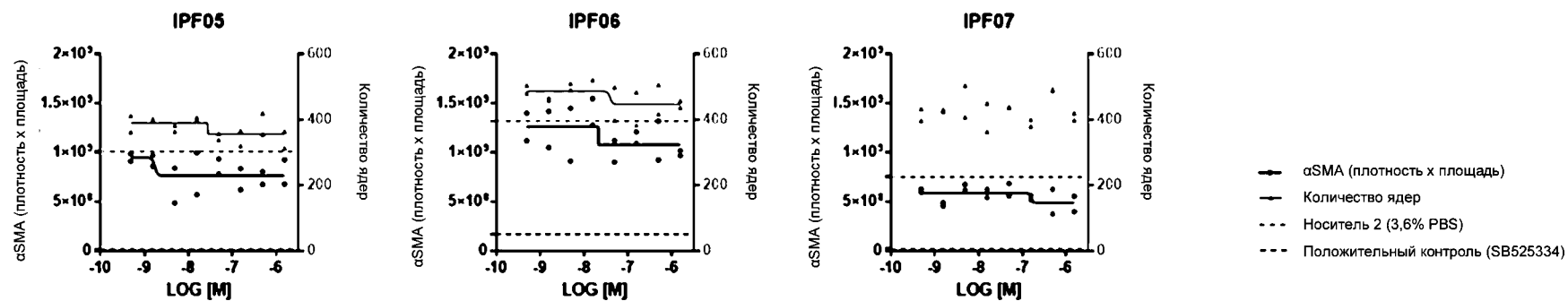
21. Ингибитор по любому из пунктов 1-18, или полинуклеотид, или вектор, или клетка по п. 19 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно, для применения при лечении и/или профилактике фиброза или фиброзного состояния, предпочтительно склеродермии или легочного фиброза, предпочтительно, очаговой склеродермии, фиброза в результате реакции трансплантат против хозяина (GVHD), келоидного и гипертрофического рубца, субэпителиального фиброза, эндомиокардиального фиброза, фиброза матки, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, нефрогенного системного фиброза, рубцевания после операции, астмы, аберрантного заживления ран, мультифокального фибросклероза, криптогенного фиброзирующего альвеолита (CFA) и идиопатического легочного фиброза (IPF).

22. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор по любому из пунктов 1-19, или полинуклеотид, или вектор, или клетку по п. 20, и фармацевтически приемлемый носитель, предпочтительно, для применения при лечении фиброза или фиброзного состояния, предпочтительно, указанная композиция дополнительно содержит терапевтический агент.

A

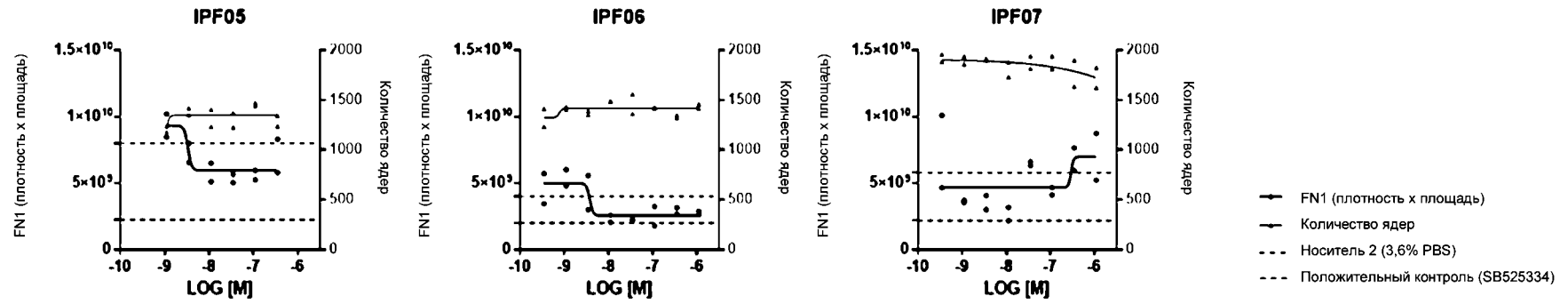


B

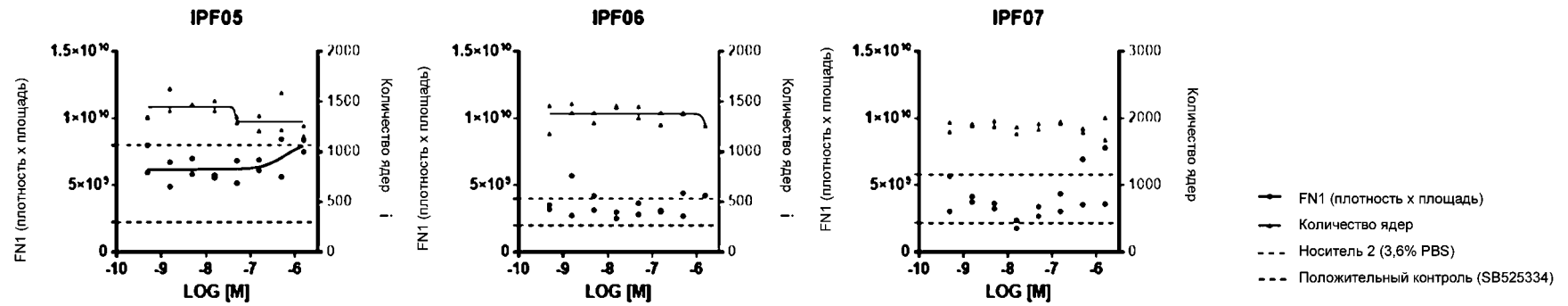


ФИГ. 1

A



B



Фиг. 2