

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292100** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.10.24**

(51) Int. Cl. *C07K 16/40* (2006.01)  
*A61P 17/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.02.01**

---

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ KLK5**

---

(31) **2001447.8**

(32) **2020.02.03**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2021/052245**

(87) **WO 2021/156170 2021.08.12**

(71) Заявитель:  
**ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)**

(72) Изобретатель:

**Деди Ниша, Эллиот Питер Чарльз,  
Лейсен Сеппе Франс Роман, Мэйсон  
Шон, Макмиллан Дэвид Джеймс, Несс  
Гиллиан Клэр, Пенго Никколо, Редхэд  
Мартин Энтони, Тернер Элисон,  
Тайсон Керри Луиз (GB)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые связывают и ингибируют KLK5, и к способам их применения для лечения заболеваний, вызванных дисбалансом KLK5. В частности, настоящее изобретение относится к ингибирующим антителам, связывающим KLK5, к их применению при лечении болезни Нетертона, атопического дерматита и онкологического заболевания.

**202292100**

**A1**

**A1**

**202292100**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574864EA/061

### АНТИТЕЛА ПРОТИВ KLK5

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связывают и ингибируют KLK5, и к способам их применения для лечения заболеваний, вызванных нарушением регуляции KLK5. В частности, настоящее изобретение относится к антителам против KLK5 и их применению для лечения болезни Нетертона, ихтиоза, такого как врожденный ихтиоз, атопического дерматита и онкологического заболевания.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Калликреин-родственные пептидазы (известные как KLK) составляют единое семейство из 15 высококонсервативных трипсин- или химотрипсиноподобных сериновых протеаз, кодируемых самым большим непрерывным кластером генов, кодирующих протеазы, (хромосома 19q13.4) в геноме человека (Sotiropoulou G. et al., 2009; JBC 284:48, 32989-94).

KLK синтезируются в виде неактивных пре-про-форм, которые протеолитически обрабатываются для секреции неактивных проформ. Такие проформы впоследствии активируются с образованием зрелых пептидаз путем специфического протеолитического удаления их N-концевого пропептида либо другими KLK, либо эндопептидазами, либо автокаталитическим расщеплением, таким как для калликреина 5 (KLK5).

KLK5 обнаружен в нескольких тканях, но наиболее обильно экспрессируется в коже. Наряду с KLK7, KLK5 экспрессируется на верхних шиповатых и зернистых уровнях кожи вместе с KLK7, где кератиноциты подвергаются терминальной дифференцировке и трансформируются в корнеоциты, формирующие роговой слой. Роговой слой функционирует как барьер для внешней среды и поддерживается за счет постоянного замещения корнеоцитов, утраченных в процессе десквамации. Поскольку KLK5 способен активировать про-KLK7 и другие калликреины, его роль в десквамации очень важна.

После активации зрелый KLK5 инактивируется эндогенным ингибитором лимфоэпителиального ингибитора Казаль-типа (ЛЕКТИ), который кодируется геном SPINK5 (Chavans P et al., 2005; Nat Genet 37, 56-65). ЛЕКТИ содержит 15-доменные домены-ингибиторы сериновых протеаз, образующие плотный комплекс с KLK5. Изменение pH определяет это тесное взаимодействие с кислым pH с высвобождением активного KLK5 из комплекса (Deraison C et al. 2007; Mol Biol Cell 18 3607-19).

Мутации с потерей функции в гене SPINK5 вызывают синдром Нетертона, редкое аутосомно-рецессивное заболевание кожи, характеризующееся признаками ихтиоза с выраженным воспалением, шелушением кожи, повышенным уровнем IgE и постоянными аллергическими проявлениями (Hovnanian A. 2013; Cell Tissue Res 351 289-300). Вследствие гиперактивности эпидермальной протеазы отсутствие ЛЕКТИ вызывает отслоение рогового слоя, вызванное активностью KLK5 в отношении десмоглеина и десмосом, что, в свою очередь, способствует высокой проницаемости для различных

аллергенов, вызывающих поражения, подобные atopическому дерматиту. Активность KLK5 в отношении KLK7 также способствует нарушению кожного барьера, что приводит к проникновению аллергенов и микробов и продуцированию IL-1β.

Мыши SPINK5<sup>-/-</sup> повторяют фенотип, очень напоминающий синдром Нетертона, воспроизводящий кожные и воспалительные аспекты заболевания (Yant T et al.; 2004, Genes Dev 18 2354-58). SPINK5<sup>-/-</sup>-эпидермис пациентов с синдромом Нетертона демонстрирует беспрепятственную активность протеаз KLK5 и KLK7, которая, по-видимому, поддерживает активацию провоспалительных и просигнальных путей, включая ось KLK5-PAR2-TSLP (стромальный лимфопоэтин тимуса).

Как у мышей SPINK5<sup>-/-</sup>, так и у KLK5<sup>-/-</sup> нокаута KLK5 было достаточно для коррекции таких кожных проявлений нокаута LEKTI, что иллюстрирует решающую роль KLK5 в гомеостазе кожи.

В последние годы в нескольких исследованиях сообщалось о генетической связи между atopическим дерматитом (AD) и полиморфизмом LEKTI с выраженными аномальными вариантами LEKTI (Hovnanian A. 2013; Cell Tissue Res 351 289-300).

До настоящего времени проводились только терапии, направленные на замену LEKTI, включая добавление генов с помощью лентивирусного или аденовирусного вектора, несущих SPINK5, и аутологичных трансплантатов генетически скорректированных кератиноцитов пациентов (Di WL. Et al.; 2011, Mol Ther 19 408-16).

Следовательно, остается потребность в анти-KLK5 терапии, такой как пассивно-иммунная терапия, направленная на ингибирование KLK5, которая могла бы оказывать терапевтическое действие при заболеваниях, связанных с нарушением регуляции KLK5 или вызванных этим.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение направлено на указанную выше потребность путем предоставления ингибирующих антител против KLK5 в соответствии со следующими вариантами осуществления.

Вариант осуществления 1: антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где указанное антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

а. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 2: антитело в соответствии с вариантом осуществления 1, где:

а. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID

NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 3: антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

Вариант осуществления 4: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 3, где эпитоп охарактеризован с помощью рентгеноструктурного анализа.

Вариант осуществления 5: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-4, где антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5.

Вариант осуществления 6: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-5, где антитело связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI.

Вариант осуществления 7: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где антитело не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5.

Вариант осуществления 8: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, где антитело образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI.

Вариант осуществления 9: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 6-8, где фрагмент LEKTI представляет собой домен 5 LEKTI человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 54, или домен 8 LEKTI, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 61.

Вариант осуществления 10: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело связывается с KLK5 человека, предпочтительно с KLK5 человека, содержащим SEQ ID NO: 53, и KLK5 яванского макака (супо), предпочтительно с KLK5 яванского макака, содержащим SEQ ID NO: 60.

Вариант осуществления 11: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело не связывается с калликреином 2 человека или яванского макака (KLK2); или калликреином 4 человека или яванского макака (KLK4); или калликреином 7 человека или яванского макака (KLK7).

Вариант осуществления 12: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-11, где указанное антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 13: Антитело в соответствии с любым из предыдущих

вариантов осуществления, где антитело представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

Вариант осуществления 14: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

Вариант осуществления 15: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 13, где полноразмерное антитело выбирают из IgG1, IgG4 или IgG4P.

Вариант осуществления 16: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-13, где антитело выбирают из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dAb или VHH.

Вариант осуществления 17: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-16, где антитело содержит:

a. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и/или

b. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43.

Вариант осуществления 18: антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-15 или 17, где антитело содержит:

a. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25; и

b. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Вариант осуществления 19: Антитело в соответствии с вариантами осуществления 17 или 18, где аминокислотный остаток глутамина (Gln; Q) в L-CDR1 в положении 24 применительно к SEQ ID NO: 15 или 17 заменен аргинином (Arg; R) или лизином (Lys; K).

Вариант осуществления 20: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где KLK5 представляет собой KLK5 человека, содержащий SEQ ID NO: 51, или 52, или 53, или супо KLK5, содержащий SEQ ID NO: 60.

Вариант 21: Антитело, которое:

a. Конкурирует за связывание KLK5 с антителом в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20; и/или

b. перекрестно блокирует или перекрестно блокируется антителом в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 для связывания KLK5; и/или

c. связывается с KLK5 с тем же эпитопом, что и антитело, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20; и/или

d. содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45; и/или

e. содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25.

Вариант осуществления 22: выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20.

Вариант осуществления 23: выделенный полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 22, где полинуклеотид кодирует:

a. вариабельную область легкой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или

ii. содержит SEQ ID NO: 8 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидов 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидов 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или

b. вариабельную область тяжелой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или

ii. содержит SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или

c. легкую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

ii. содержит SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 101, или 102, или 103, или 104; или

d. тяжелую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или

ii. содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46.

Вариант осуществления 24: Клонированный или экспрессируемый вектор, содержащий один или более полинуклеотидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 22 или 23.

Вариант осуществления 25: клетка-хозяин, содержащая:

a. один или более полинуклеотидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 22 или 23 или

b. один или более экспрессируемых векторов в соответствии с вариантом осуществления 24.

Вариант осуществления 26: Способ получения антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с вариантом осуществления 25 в подходящих условиях для получения антитела и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

Вариант осуществления 27: Фармацевтическая композиция, содержащая антитело в

соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей.

Вариант осуществления 28: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 27 для применения в терапии.

Вариант осуществления 29: антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 27 для применения при лечении заболевания, характеризующегося нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

Вариант осуществления 30: антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 29, где заболевание выбирают из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации.

Вариант осуществления 31: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 30, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

Вариант осуществления 32: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 30, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

Вариант 33: Способ лечения заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5 у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 или фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления 27.

Вариант осуществления 34: Способ в соответствии с вариантом осуществления 33, где заболевание выбирают из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря.

Вариант осуществления 35: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 34, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

Вариант осуществления 36: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 34, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Эксклюзионная хроматография (SEC). На панелях А и В показаны профили элюирования индивидуально KLK5 человека (сплошная линия, крайний справа), только кроличьего Fab-антитела 10236 (точечная линия), KLK5 человека+LEKTI D5 (длинная пунктирная линия, панель А) или человеческий KLK5+LEKTI D8 (длинная пунктирная линия, панель В) и человеческий KLK5+LEKTI D5+кроличье Fab-антитело 10236 (короткая пунктирная линия, крайний слева, панель А) или человеческий KLK5+LEKTI D8+кроличье Fab-антитело 10236 (короткая пунктирная линия слева, панель В).

Фигура 2. SDS-PAGE пиковых фракций из SEC, показанных на Фигурах 1А и 1В.

Дорожка 1, маркеры MW. Дорожка 2, пиковая фракция бинарного комплекса KLK5+LEKTID5 человека. Дорожка 3, пиковая фракция тройного комплекса KLK5+LEKTID5+кроличье Fab-антитело 10236. Дорожка 4, пиковая фракция бинарного комплекса KLK5+LEKTID8. Дорожка 5, пиковая фракция тройного комплекса KLK5+LEKTID8+ кроличье Fab-антитело 10236.

Фигура 3. SDS-PAGE KLK5, полученный для рентгеноструктурных исследований. Дорожка M, маркеры MW. Дорожка 1, KLK5 человека, очищенный из культур, выращенных в присутствии кифунензина (kif). Дорожка 2, KLK5 человека, очищенный из культур кифунензина и обработанный эндогликозидазой H (Endo H).

Фигура 4. Схематическое изображение эпитопа KLK5 человека в комплексе с кроличьим Fab-антителом 10236. А) Тяжелая (темно-серая) и легкая (светло-серая) цепи Fab показаны на фигуре и на прозрачной поверхности. KLK5 показан черной лентой. Остатки KLK5, которые являются частью эпитопа на KLK5 человека, связанного с антителом 10236, изображены в виде черных палочек. В) Лейпептин (поверхность и палочки), смоделированный в кристаллической структуре KLK5 (лента), связанный с кроличьим Fab10236 (поверхность визуализируется). Fab10236 связывается с 99-й петлей на KLK5. С) Наложение кристаллических структур 2PSX (белый, без цинка) и 2PSY (серый, с цинком), выделяющее движения в положениях 99-петли и боковой цепи His147 и His150 на KLK5 в присутствии цинка. Лейпептин показан белой поверхностью и палочками. D) Наложение кристаллической структуры 2PSX (KLK5, связанный с лейпептином) на кристаллическую структуру KLK5 в комплексе с Fab10236. Выделены движения в положениях 99-петли и боковой цепи His147 и His150 при сравнении обеих структур. Конформации петли и остатков His в кристаллической структуре 2PSX и кристаллической структуре Fab10236, связанного с KLK5, показаны белым и черным цветом соответственно. Белый пунктирный прямоугольник вокруг His147 (кристаллическая структура 2PSX) указывает на то, что эта конформация конфликтует с Fab10236 (серая поверхность). His147 находится в другой конформации в структуре KLK5-Fab10236. Белый пунктирный кружок вокруг His150 (черный, как видно в комплексе KLK5 с Fab10236) указывает на карман S2 активного центра KLK5, где будет связываться субстрат, такой как лейпептин. Лейпептин (серая поверхность и палочки) из кристаллической структуры 2PSX показывает, где ожидается связывание субстрата в активном центре KLK5.

Фигура 5. Две ориентации кристаллической структуры KLK5 человека в комплексе с кроличьими Fab-антителами 10236 и 10273. Человеческий KLK5 показан в виде ленты, кроличьи Fab-антитела 10236 и 10273 показаны сплошными поверхностями.

Фигура 6. Гуманизация последовательности вариабельной области легкой цепи кролика антитела 10236. Трансплантаты 10236gL5, gL6, gL7 и gL8 представляют собой гуманизированные трансплантаты кроличьей вариабельной области легкой цепи антитела 10236 с использованием зародышевой линии человека IGKV1-6 в качестве акцепторного каркаса. Донорные остатки выделены жирным шрифтом/курсивом и заштрихованы

серым: Y2, D3 и K63. CDR выделены жирным шрифтом/подчеркнуты. Мутации в CDRL1 для увеличения pI выделены жирным шрифтом/подчеркнуты и выделены: Q24R или Q24K.

Фигура 7. Гуманизация последовательности варибельной области тяжелой цепи кролика антитела 10236. Трансплантаты 10236gH9, gH10, gH11, gH12 и gH14 представляют собой гуманизированные трансплантаты кроличьей варибельной области тяжелой цепи антитела 10236 с использованием зародышевой линии человека IGHV4-4 в качестве акцепторного каркаса. CDR выделены жирным шрифтом/подчеркнуты. Донорные остатки выделены жирным шрифтом/курсивом и заштрихованы серым цветом: F67, Q71, S73, T76 и V78.

Фигура 8. Ингибирующая активность антитела 10236gL6gH12 по сравнению с панелью калликрейна и LEKTI D5 Fc кролика по сравнению с KLK5 человека и яванского макака.

Фигура 9. Ингибирование высвобождения IP-1 из клеток HaCat с помощью Ab 10236 gL6gH12. Высвобождение IP-1 стимулировали добавлением KLK5 к клеткам HaCat. Антитело 10236 gL6gH12 достигло почти полного ингибирования IP-1 до уровня, сравнимого с эталонным белком LEKTI D5 Fc кролика. A33 Hu IgG4 представляет собой изотипический контроль.

Фигура 10. Механизм действия антитела 10236 gL6gH12 (A) и родительского кроличьего антитела (B). Значения Kobs были нанесены на график в зависимости от концентрации субстрата для антитела 10236 и LEKTI D5 Fc кролика (последний только в (A)). Представленные данные относятся к 10 нМ антитела 10236 и 2 нМ LEKTI D5 Fc кролика. Наклоны показывают, что антитело 10236 является неконкурентным ингибитором, в то время как белок LEKTI является конкурентным ингибитором.

Фигура 11. Окрашивание гематоксилином и эозином, показывающее структуру кожи и целостность рогового слоя в модели реконструированного эпидермиса кожи человека. Влияние среды, MC903 с антителом 10236 gL6gH12 IgG4P (Ab 10236) или без него или с изотипическим контролем (hIgG4P).

Фигура 12. Зимографический анализ *in situ*, показывающий активность сериновой протеазы в срезах кожи с атопическим дерматитом, обработанных контрольным буфером (A) или антителом 10236 gL6gH12 IgGP4 (B).

Фигура 13. Стресс-исследование антитела 10236gL6gH12 IgG4P (названного 10236gL6gH12) для оценки склонности к дезамидированию мотива Asn(94)Ser на CDR3 легкой цепи.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание теперь будет описано в отношении конкретных неограничивающих аспектов и вариантов их осуществления, а также со ссылкой на некоторые фигуры и примеры.

Технические термины используются в соответствии с их общепринятыми значениями, если не указано иное. Если определенным терминам придается определенное

значение, определения терминов будут даны в контексте, в котором эти термины используются.

В тех случаях, когда термин «содержащий» используется в настоящем описании и формуле изобретения, он не исключает другие элементы. Для целей настоящего раскрытия термин «состоящий из» считается предпочтительным вариантом осуществления термина «состоящий из».

В случае использования существительного в единственном числе, это включает множественное число этого существительного, если не указано иное.

Используемый в настоящем описании термин «лечение» и т.п. относится к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. Таким образом, лечение охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не диагностирован как имеющий его; b) ингибирование заболевания, т. е. прекращение его развития; и (с) облегчение заболевания, т. е. вызывание регрессии заболевания.

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела KLK5, которое при введении млекопитающему или другому пациенту для лечения заболевания достаточно для осуществления такого лечения заболевания. Терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от антитела против KLK5, заболевания и его тяжести, а также возраста, массы и т. д. пациента, подлежащего лечению.

Термин «выделенный» означает во всем этом описании, что антитело или полинуклеотид, в зависимости от обстоятельств, существуют в физической среде, отличной от той, в которой они могут встречаться в природе.

В первом аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где указанное антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

а. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Предпочтительно антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5) и содержит переменную область легкой цепи, содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего

изобретения антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, характеризуется переменной областью легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменной областью тяжелой цепи, которая содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Калликреин 5 (KLK5, KLK-L2, SCTE или любой другой известный синоним) обладает трипсиноподобной активностью. Он экспрессируется в пре-про-форме и содержит сигнальный пептид из 29 аминокислот в соответствии с инструментом биоинформатики SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>), за которым следует 37 аминокислот последовательности пропептида. Расщепление пропептида дает активный зрелый фермент, состоящий из 237 аминокислот, имеющих активный центр с каталитической триадой остатков, типичной для серин-протеазы (Michael I.P et al., 2005; JBC 280:15, 14628-35).

Если не указано иное, термин KLK5 относится к любым нативным пре- и проформам (т. е. к непроцессированному KLK5, содержащему сигнальную последовательность и активационный пептид), вариантам альтернативного сплайсинга или природным вариантам, мутантам и KLK5 других видов (мышь, яванский макак и т. д.) и к активному KLK5 (в результате ауторасщепления или иным образом). Когда указан KLK5 человека, то KLK5 человека содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 53 (активный KLK5 человека). Другие последовательности KLK5, упомянутые в настоящем описании, включают SEQ ID NO: 52 (проформа KLK5 человека без сигнальной последовательности) или SEQ ID NO: 51 (полноразмерный KLK5 человека с сигнальной и пропептидной последовательностями), последовательность, соответствующую Uniprot Q9Y337, или природные варианты, содержащие мутации в положениях 55 и 153 (применительно к SEQ ID NO: 51). Примеры этих мутаций включают KLK5 человека, содержащий остатки 23-293 из SEQ ID NO: 51 с мутациями, заменяющими Gly на Arg в остатке 55 (G55R) и/или Asp на Asn в остатке 153 (D153N).

Антитело по настоящему изобретению содержит области, определяющие комплементарность (CDR), три из тяжелой цепи и три из легкой цепи. Как правило, CDR находятся в каркасе и вместе образуют переменную область. По соглашению CDR в переменной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента обозначаются как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, а в переменной области легкой цепи - как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3. Они нумеруются последовательно в направлении от N-конца к C-концу каждой цепи.

CDR обычно нумеруются в соответствии с системой, разработанной Kabat et al. Эта система изложена в Kabat et al., 1991, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее «Kabat et al. (выше)'). Эта система нумерации используется в настоящем описании, если не указано иное.

Обозначения остатков по Kabat не всегда соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или дополнительные аминокислоты, чем в строгой нумерации по Kabat, соответствуя укорачиванию или вставке структурного компонента, будь то каркасная область или область, определяющая комплементарность (CDR) основной структуры переменного домена. Корректная нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания остатков гомологии в последовательности антитела со «стандартной» нумерованной последовательностью по Kabat.

CDR переменного домена тяжелой цепи локализованы в остатках 31-35 (CDR-H1), остатках 50-65 (CDR-H2) и остатках 95-102 (CDR-H3) согласно системе нумерации Kabat. Однако согласно Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, простирается от остатка 26 до остатка 32. Таким образом, если не указано иное, термин «CDR-H1», используемый в настоящем описании, относится к остаткам 26-35, как описано комбинацией системы нумерации Kabat и определения топологической петли Chothia.

CDR переменного домена легкой цепи локализованы в остатках 24-34 (CDR-L1), остатках 50-56 (CDR-L2) и в остатках 89-97 (CDR-L3) согласно системе нумерации Kabat.

В дополнение к петлям CDR существует четвертая петля между CDR-2 (CDR-L2 или CDR-H2) и CDR-3 (CDR-L3 или CDR-H3), которая образована каркасом 3 (FR3). Система нумерации Kabat определяет каркас 3 как положения 66-94 в тяжелой цепи и положения 57-88 в легкой цепи.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62; CDR-L2, содержащий SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащий SEQ ID NO: 3; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4; CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63; CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4; CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Антитело, содержащее такие последовательности CDR, особенно соответствует изобретательскому уровню, потому что оно обеспечивает антитело с высокой аффинностью к KLK5, предпочтительно к человеческому KLK5, с высоким

ингибированием биологической функции KLK5 и высокой стабильностью, что необходимо для процесса производства. Например, мутации мотива «NS» в «ND» (применительно к SEQ ID NO: 15) в CDR-L3, содержащей SEQ ID NO: 3 (QQGYTNSNIINT;), приводили к резкому снижению аффинности KLK5.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87 (36), Ala107 (56), Arg110 (59), Lys111 (60), Lys112 (61), Val113 (62), Val137 (86), Lys138 (87), Ser139 (88), Ile140 (89), Pro141 (90), His142 (91), Pro143 (92), Tyr145 (94), Ser146 (95) и His147 (96) применительно к SEQ ID NO: 51. Предпочтительно эпитоп охарактеризован рентгеноструктурным анализом. Цифры в скобках соответствуют номенклатуре протеаз.

В предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, и где антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно, SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В рамках настоящего изобретения термин «эпитоп» используется взаимозаменяемо как для конформационных, так и для линейных эпитопов. Конформационный эпитоп состоит из прерывистых участков первичной аминокислотной последовательности антигена, а линейный эпитоп образован последовательностью, образованной непрерывно расположенными аминокислотами.

Эпитоп можно идентифицировать любым подходящим способом картирования эпитопа, известным в данной области, в комбинации с любым из антител, предложенных в настоящем изобретении. Примеры таких способов включают скрининг пептидов различной длины, полученных из полноразмерного KLK5, на связывание с антителом или его фрагментом по настоящему изобретению и идентификацию наименьшего фрагмента, который может специфически связываться с антителом, содержащим последовательность эпитопа, распознаваемую антителом. Пептиды KLK5 могут быть получены синтетическим путем или путем протеолитического расщепления KLK5. Пептиды, которые связываются с антителом, могут быть идентифицированы, например, с помощью анализа масс-спектрометрии. Для идентификации эпитопа, связанного с антителом, можно использовать такие методики, как ЯМР-спектроскопия или рентгеноструктурный анализ. Как правило, когда определение эпитопа проводят с помощью рентгеноструктурного анализа, аминокислотные остатки антигена в пределах 4 Å от CDR считаются

аминокислотными остатками, входящими в состав эпитопа. После идентификации эпитоп может служить для получения фрагментов, которые связывают антитело по настоящему изобретению, и, при необходимости, использоваться в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связывают тот же самый эпитоп.

Эпитоп, указанный в аспектах и вариантах осуществления, описывающих настоящее изобретение, предпочтительно представляет собой эпитоп, охарактеризованный с помощью рентгеноструктурного анализа.

Термин «антитело», используемый в контексте настоящего описания, включает цельные антитела и их функционально активные фрагменты, т. е. молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген, также называемые антигенсвязывающими фрагментами. Особенности, описанные в настоящем документе в отношении антител, также применимы к антигенсвязывающим фрагментам, если из контекста не следует иное. Антитело может быть моноклональным, поливалентным, полиспецифическим, биспецифическим, полностью человеческим, гуманизированным или химерным (или их производным).

Цельные антитела, также известные как «иммуноглобулины (Ig)», как правило, относятся к интактным или полноразмерным антителам, т. е. содержащим элементы двух тяжелых цепей и двух легких цепей, соединенных между собой дисульфидными связями, которые в совокупности образуют характерную Y-образную трехмерную структуру. Классические природные цельные антитела являются моноспецифическими в том смысле, что они связывают один тип антигена, и двухвалентными в том, что они имеют два независимых антигенсвязывающих домена. Термины «интактное антитело», «полноразмерное антитело» и «цельное антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения моноспецифического двухвалентного антитела, имеющего структуру, аналогичную структуре нативного антитела, включая Fc-область, как определено в настоящем документе.

Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно VL) и константной области легкой цепи (CL). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи (CH), состоящей из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 или четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4, в зависимости от класса Ig. «Класс» Ig или антитела относится к типу константной области и включает IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термины «константная(ые) область(и)» или «константный(ые) домен(ы)», используемые в настоящем документе, используются взаимозаменяемо для обозначения домена(ов) антитела, который находится вне вариабельных областей. Константные

домены идентичны во всех антителах одного и того же изотипа, но отличаются от одного изотипа к другому. Как правило, константная область тяжелой цепи образована от N к C-концу в виде CH1-шарнир-CH2-CH3-необязательно CH4, включая три или четыре константных домена.

Домены константной области молекулы антитела по настоящему изобретению, если они присутствуют, могут быть выбраны с учетом предполагаемой функции антитела и, в частности, эффекторных функций, которые могут потребоваться. Например, домены константных областей могут представлять собой домены человеческих IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В частности, можно использовать домены константной области IgG человека, особенно изотипов IgG1 и IgG3, когда антитело предназначено для терапевтического применения и требуются эффекторные функции антитела. Альтернативно, изотипы IgG2 и IgG4 можно использовать, когда антитело предназначено для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не требуются. Понятно, что также могут использоваться варианты последовательности этих доменов константных областей. Например, IgG4, в котором серин в положении 241 (нумерация по системе нумерации Kabat) был заменен на пролин, как описано Angal et al. (Angal et al., 1993). Можно использовать замену одной аминокислоты, которая устраняет гетерогенность химерного антитела мыши/человека (IgG4), наблюдаемую во время анализа SDS-PAGE (Mol Immunol 30, 105-108). Далее это обозначено IgG4P. Эта единственная аминокислотная замена предотвращает естественную склонность тяжелых цепей молекул IgG4 к замене с образованием химерных молекул.

«Fc-область», «Fc-фрагмент» или просто «Fc» используются взаимозаменяемо для обозначения C-концевой области антитела, содержащей константную область антитела, за исключением первого иммуноглобулинового домена константной области. Таким образом, Fc относится к последним двум константным доменам, CH2 и CH3 IgA, IgD и IgG или к трем последним константным доменам IgE и IgM, а также к гибкому шарнирному N-концу этих доменов. Fc-область тяжелой цепи IgG1 человека определена в настоящем документе как содержащая остатки C226 до его карбокси-конца, где нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat. В контексте человеческого IgG1 нижняя петля относится к положениям 226-236, домен CH2 относится к положениям 237-340, а домен CH3 относится к положениям 341-447 в соответствии с индексом EU по Kabat. Соответствующая Fc-область других иммуноглобулинов может быть идентифицирована путем выравнивания последовательностей.

В контексте настоящего изобретения, если они присутствуют, то константная область или Fc-область могут быть природными, как определено выше, или же могут быть модифицированы различными способами при условии, что они содержат функциональный FcR-связывающий домен и, предпочтительно, функциональный FcRn-связывающий домен. Предпочтительно модифицированная константная область или Fc-область приводят к улучшению функциональных возможностей и/или фармакокинетики. Модификации могут включать делецию определенных частей Fc-фрагмента.

Модификации могут дополнительно включать различные аминокислотные замены, способные влиять на биологические свойства антитела. Также могут присутствовать мутации для увеличения связывания FcRn и, таким образом, периода полужизни *in vivo*. Модификации могут дополнительно включать модификации профиля гликозилирования антитела. Природный фрагмент Fc гликозилирован в домене CH2 с присутствием на каждой из двух тяжелых цепей N-гликана, связанного с остатком аспарагина в положении 297 (Asn297). В контексте настоящего изобретения антитело может быть гликомодифицировано, т. е. сконструировано таким образом, чтобы оно имело определенный профиль гликозилирования, который, например, приводит к улучшенным свойствам, например, к улучшенной эффекторной функции или улучшенному периоду полужизни в сыворотке.

Антигенсвязывающие фрагменты антител включают одноцепочечные антитела (например, scFv<sub>an</sub> и dsscFv), Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, однодоменные антитела или наноантитела (например, VH или VL, или VHH или VNAR). Другие фрагменты антител для использования в настоящем изобретении включают Fab- и Fab'-фрагменты, описанные в международных патентных заявках WO2011/117648, WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171 (все они включены в настоящий документ в качестве ссылки).

Методы создания и получения таких фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181).

Типичный «Fab'-фрагмент» или «Fab'», используемый в настоящем описании, включает пару тяжелой и легкой цепей, в которой тяжелая цепь содержит переменную область VH, константный домен CH1 и природную или модифицированную шарнирную область, а легкая цепь содержит переменную область VL и константный домен CL. Димеры Fab' согласно настоящему описанию создают F(ab')<sub>2</sub>, где, например, димеризация может происходить через шарнир.

Термин «однодоменное антитело», используемый в настоящем описании, относится к фрагменту антитела, состоящему из одного мономерного переменного домена антитела. Примеры однодоменных антител включают VH, или VL, или VHH, или V-NAR.

«Fv» относится к двум переменным доменам, например, кооперативным переменным доменам, таким как родственная пара или переменные домены с созревшей аффинностью, то есть пара VH и VL.

«Одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv», используемый в настоящем описании, относится к одноцепочечному переменному фрагменту, который стабилизирован пептидным линкером между переменными доменами VH и VL.

«Дисульфид-стабилизированный одноцепочечный переменный фрагмент» или «dsscFv», используемый в настоящем описании, относится к одноцепочечному переменному фрагменту, который стабилизирован пептидным линкером между

вариабельными доменами VH и VL, а также включает междоменную дисульфидную связь между VH и VL. (см., например, Weatherill et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012, WO2007109254.

Дисульфидная связь между вариабельными доменами VH и VL находится между двумя остатками, перечисленными ниже (если в контексте не указано иное, в приведенном ниже списке используется нумерация Kabat) (Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997); Weatherill et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012; J Biochem. 118, 825-831 Luo et al (1995); FEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995); Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 pp.7538-7542 Brinkmann et al (1993); Proteins 19, 35-47 Jung et al (1994) Biochemistry 29 1362-1367; Glockshuber et al (1990). Везде, где делается ссылка на нумерацию по Kabat, соответствующей ссылкой является Kabat et al., 1991 (5th edition, Bethesda, Md.), in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA.

VH37+VL95C;

VH44+VL100;

VH44+VL105;

VH45+VL87;

VH55+VL101;

VH100+VL50;

VH100b+VL4

VH98+VL 46;

VH101+VL46;

VH105+VL43,

VH106+VL57;

и положение или положения, соответствующие им в паре вариабельных областей, расположенных в молекуле.

Термин «антитело», используемый в настоящем описании, также включает моновалентные, т. е. антитела, содержащие только один антигенсвязывающий домен (например, одноцепочечные антитела, содержащие полную размерную тяжелую цепь и полную размерную легкую цепь, соединенные между собой, также называемое «полуантитело»).

Термин «антитело» также охватывает поливалентные антитела, обладающие множественными специфичностями, например, биспецифические, триспецифические или полиспецифические антитела.

Термин «полиспецифическое» или «полиспецифическое антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителу, как описано в настоящем документе, которое имеет по меньшей мере два связывающих домена, то есть два или более связывающих домена, например, два или три связывающих домена, где по меньшей мере два связывающих домена независимо связывают два разных антигена или два разных эпитопа на одном и том же антигене (также называемые полипаратопными).

Полиспецифические антитела обычно являются моновалентными для каждой специфичности (антигена). Полиспецифические антитела, описанные в настоящем документе, охватывают моновалентные и поливалентные антитела, например, бивалентные, трехвалентные, четырехвалентные полиспецифические антитела.

«Антигенсвязывающий домен», используемый в настоящем описании, относится к части антитела, которая содержит часть или все из одного или более переменных доменов, например, часть или все из пары переменных доменов VH и VL, которые специфически взаимодействуют с антигеном-мишенью. Связывающий домен может содержать однодоменное антитело. В одном варианте осуществления каждый связывающий домен является моновалентным. Предпочтительно каждый связывающий домен содержит не более одного VH и одного VL.

В данной области известны различные форматы полиспецифических антител. Были предложены различные классификации, но форматы полиспецифических антител IgG обычно включают биспецифические IgG, присоединенные IgG, полиспецифические (например, биспецифические) фрагменты антител, полиспецифические (например, биспецифические) слитые белки и полиспецифические (например, биспецифические) конъюгаты антител, как описано, например, в Spiess et al., *Mol Immunol.* 67 (2015): 95-106.

Методы получения биспецифических антител включают, но не ограничиваются этим, технологию CrossMab (Klein et al., *Methods* 154 (2019) 21-31), технологию «выступ-во-впадину» (например, WO1996027011, WO1998050431), технологию DuoBody (например, WO2011131746), Асимметричную технологию (например, WO2012058768). Дополнительные технологии получения биспецифических антител описаны, например, в Godar et al., 2018, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28:3, 251-276. Биспецифические антитела включают, в частности, антитела CrossMab, DAF (два в одном), DAF (четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, обычные LC типа «выступ-во-впадину», сборку «выступ-во-впадину», пару по заряду, Обмен Fab-плечами, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κ-тело и ортогональные Fab.

Дополненные IgG классически включают полноразмерные IgG, сконструированные путем добавления дополнительного антигенсвязывающего домена или антигенсвязывающего фрагмента к N- и/или C-концу тяжелой и/или легкой цепи IgG. Примеры таких дополнительных антигенсвязывающих фрагментов включают антитела sdAb (например, VH или VL), Fv, scFv, dsccFv, Fab, scFav. Форматы дополненных антител IgG включают, в частности, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG( H)-V, V(H)-IgG, IgC(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody и DVI-IgG (четыре-в-одном), например, как описано Spiess et al., *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol.* 67 (2015): 95-106.

Фрагменты полиспецифических антител включают наноантитело, наноантитело-NAS, BiTE, диантитело, DART, TandAb, sc-Диантитело, sc-Диантитело-CH3, Диантитело-CH3, тройное антитело, миниантитело; Минитело, минитело Tri Bi, scFv-CH3 KIH, Fab-

scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>, scFv-КИН, Fab-scFv-Fc, четырехвалентное HCAb, sc-Диантитело -Fc, Диантитело-Fc, тандем scFv-Fc; и интраантитело, как описано, например, Spiess et al., для биспецифических антител. *Mol Immunol.* 67 (2015): 95-106.

Полиспецифические слитые белки включают «Dock and Lock», ImmTAC, HSAbody, scDiabody-HAS и тандем scFv-токсин. Конъюгаты полиспецифических антител включают IgG-IgG; Cov-X-Body; и scFv1-PEG-scFv2.

Дополнительные форматы полиспецифических антител описаны, например, в Brinkmann and Kontermann, *mAbs*, 9:2, 182-212 (2017), в частности на Фигуре 2, например, тандемный scFv, тройное антитело, Fab-VNH, taFv-Fc, scFv4- Ig, scFv2-Fcab, scFv4-IgG. Биантитела, триантитела и способы их получения раскрыты, например, в WO 99/37791.

Дополненный IgG и дополненный Fab содержат весь IgG или Fab-фрагмент, соответственно, которые сконструированы путем добавления по меньшей мере одного дополнительного антигенсвязывающего домена (например, двух, трех или четырех дополнительных антигенсвязывающих доменов), например, однодоменного антитела (такого как как VH или VL, или VNH), scFv, dsscFv, dsFv к N- и/или C-концу тяжелой и/или легкой цепи указанного IgG или Fab, например, как описано в WO 2009/040562, WO 2010035012, WO 2011/030107, WO 2011/061492, WO 2011/061246 и WO 2011/086091, которые все включены в настоящий документ в качестве ссылки. В частности, формат Fab-Fv был впервые раскрыт в WO 2009/040562, а его стабилизированная дисульфидом версия, Fab-dsFv, впервые раскрыта в WO 2010/035012. Единственный линкер Fab-dsFv, в котором dsFv соединен с Fab через один линкер между доменом VL или VH Fv и C-концом LC или HC Fab, впервые описан в WO 2014/096390, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Дополненный IgG, содержащий полноразмерный IgG1, сконструированный путем добавления dsFv к C-концу тяжелой или легкой цепи IgG, впервые описан в WO 2015/197789, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Альтернативно, другой полиспецифический формат содержит Fab, связанный с двумя scFv или dsscFv, каждый из которых, scFv или dsscFv, связывает одну и ту же или другую мишень (например, один scFv или dsscFv связывается с терапевтической мишенью, а один scFv или dsscFv увеличивает время полужизни за счет связывания, например, альбумина). Такие фрагменты антител описаны в WO 2015/197772, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Другой формат содержит Fab, связанный только с одним scFv или dsscFv, как описано, например, в WO 2013/068571, включенной в настоящий документ в качестве ссылки, и в Dave et al., *Mabs*, 8(7) 1319-1335 (2016).

Другие хорошо известные форматы полиспецифических антител включают:

Диантитело, используемое в настоящем описании, относится к двум парам Fv, первой паре VH/VL и дополнительной паре VH/VL, которые имеют два линкера между Fv, так что VH первого Fv связан с VL второго Fv и VL первого Fv связан с VH второго Fv.

Триантитело, используемое в настоящем описании, относится к формату,

подобному диантителу, содержащему три Fv и три линкера между Fv.

Используемый в настоящем описании термин «тетраантитело» относится к формату, аналогичному диантителу, содержащему четыре линкера Fv и четыре линкера между Fv.

Термин «тандемный scFv», используемый в настоящем описании, относится по меньшей мере к двум scFv, связанным через один линкер, так что существует один линкер между Fv.

Тандемный scFv-Fc, используемый в настоящем описании, относится по меньшей мере к двум тандемным scFv, каждый из которых присоединен к N-концу домена CH<sub>2</sub>, например, через шарнир фрагмента константной области -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

Используемый в настоящем описании термин Fab-Fv относится к фрагменту Fv с переменной областью, присоединенной к C-концу каждого из следующих элементов: CH<sub>1</sub> тяжелой цепи и CL легкой цепи. Формат может быть представлен в виде его пегелированной версии.

Используемый в настоящем описании Fab'-Fv аналогичен FabFv, в котором часть Fab заменена частью Fab'. Формат может быть представлен в виде его пегелированной версии.

Используемый в настоящем описании Fab-dsFv относится к FabFv, в котором дисульфидная связь внутри Fv стабилизирует присоединенные C-концевые переменные области. Формат может быть представлен в виде его пегелированной версии.

Используемый в настоящем описании Fab-scFv представляет собой молекулу Fab с присоединенной к C-концу легкой или тяжелой цепи scFv.

Используемый в настоящем описании Fab'-scFv представляет собой молекулу Fab' с scFv, присоединенным к C-концу легкой или тяжелой цепи.

Используемый в настоящем описании DiFab относится к двум молекулам Fab, связанным через их C-концы тяжелых цепей.

DiFab', используемый в настоящем описании, относится к двум молекулам Fab', связанным одной или более дисульфидными связями в их шарнирной области.

Используемое в настоящем описании sc-Диантитело представляет собой диантитело, содержащее линкер внутри Fv, так что молекула содержит три линкера и образует нормальный scFv, каждый из концов VH и VL которого связан с одной из переменных областей другой пары Fv.

Sc-Диантитело-Fc, используемое в настоящем описании, представляет собой два sc-Диантитела, где каждое из них присоединено к N-концу домена CH<sub>2</sub>, например, посредством шарнира, фрагмента константной области -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

Термин ScFv-Fc-scFv, используемый в настоящем описании, относится к четырем scFv, где по одному из каждого присоединен к N-концу и C-концу как тяжелой, так и легкой цепи фрагмента -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

Термин Sc-Диантитело-CH<sub>3</sub>, используемый в настоящем описании, относится к двум молекулам sc-Диантитела, каждая из которых связана, например, шарниром с

доменом СНЗ.

Используемый в настоящем описании IgG-scFv представляет собой полноразмерное антитело с scFv на С-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей.

Используемый в настоящем описании scFv-IgG представляет собой полноразмерное антитело с scFv на N-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей.

Используемый в настоящем описании V-IgG представляет собой полноразмерное антитело с варибельным доменом на N-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей.

Используемый в настоящем описании IgG-V представляет собой полноразмерное антитело с варибельным доменом на С-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей.

DVD-Ig (также известный как IgG с двойным V-доменом) представляет собой полноразмерное антитело с 4 дополнительными варибельными доменами, по одному на N-конце каждой тяжелой и каждой легкой цепи.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где указанное антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и где указанное антитело содержит варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где:

a. варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, и ингибирует или снижает протеазную активность KLK5.

В рамках настоящего изобретения термин «ингибировать» (и его грамматические варианты) указывает на эффект, который антитела по настоящему изобретению оказывают в отношении биологической активности KLK5. Предпочтительно биологическая активность KLK5 представляет собой протеазную активность, предпочтительно активность сериновой протеазы. Эффект приводит к полному или частичному подавлению сериновой протеазной активности KLK5.

Безотносительно к какой-либо теории, считается, что антитело по настоящему изобретению связывается с KLK5 и:

i) ингибирует (например, полностью или частично) или снижает протеазную активность (предпочтительно активность сериновой протеазы) KLK5; и/или

ii) связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI и/или  
iii) не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или  
iv) образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI (т. е. образуя комплекс, который содержит антитело по настоящему изобретению, KLK5 и LEKTI или фрагмент LEKTI).

В рамках настоящего изобретения термин «LEKTI» относится к лимфоэпителиальному ингибитору, связанному с протеазой Kazal-типа, состоящему из 15 доменов, который расщепляется на более мелкие функциональные фрагменты пропротеинконвертазами, такими как протеаза фурин, в результате чего фрагменты LEKTI состоят из одного или более доменов. Эти фрагменты секретируются во внеклеточное пространство, где они могут образовывать ингибирующие комплексы с протеазами, такими как KLK5. LEKTI также известен как ингибитор сериновой протеазы Kazal-типа 5 (SPINK5) и представляет собой белок, который у человека кодируется геном SPINK5. У человека генерируются три варианта сплайсинга мРНК LEKTI, что приводит к полноразмерной, длинной и короткой изоформам белка, которые различаются только своими COOH-концевыми областями.

SPINK5 является членом кластера семейства генов, расположенного на хромосоме 5q32, который кодирует ингибиторы сериновых протеаз. Это включает другие эпидермальные белки SPINK6 и LEKTI-2 (SPINK9), которые также включены в настоящее изобретение в рамках термина «LEKTI».

Термин «образовать комплекс» (и любой его грамматический вариант) означает, что антитело по настоящему изобретению способно связывать KLK5, когда KLK5 уже связан с другим белком, таким как LEKTI, или фрагментом LEKTI, или другим антителом или фрагментом антитела, таким как Fab.

Преимущество, связанное с антителом, способным связывать KLK5 и ингибировать биологическую (т. е. протеазную) активность KLK5, но не конкурирующим с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5, может обеспечивать ингибирование активности KLK5 в условиях, когда LEKTI диссоциирует от комплекса KLK5:LEKTI, в таких как прогрессивно кислая среда от базального слоя к роговому слою эпидермиса.

Антитело, которое «конкурирует», «перекрестно блокирует», «перекрестно блокируется» или «связывается с тем же эпитопом на KLK5 человека» (и любой его грамматической вариацией), что и антитело по настоящему изобретению, относится к антителу, которое не способно образовывать комплекс с KLK5, связанным с антителом по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления согласно настоящему изобретению фрагмент LEKTI представляет собой домен LEKTI 5 человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 54, или домен LEKTI 8, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 61.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5):

i. связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI;

- ii. не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или
- iii. образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI;

где предпочтительно фрагмент LEKTI представляет собой домен LEKTI 5 человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 54, или домен LEKTI 8, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 61, и где антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с KLK5, предпочтительно с KLK5 человека, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51 и:

- i. связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI;
- ii. не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или
- iii. образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI;

где предпочтительно фрагмент LEKTI представляет собой домен LEKTI 5 человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 54, или домен LEKTI 8, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 61.

В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению связывает KLK5 человека, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 53, а также связывает KLK5 яванского макака, предпочтительно KLK5 яванского макака, содержащий SEQ ID NO: 60.

В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению не связывает калликреин 2 (KLK2) человека или яванского макака (супо); или калликреин 4 (KLK4) человека или яванского макака; или калликреин 7 (KLK7) человека или яванского макака. Другими словами, антитело специфично к KLK5, а не к другим калликреинам.

Термин «специфический» в данном контексте относится к антителу, которое распознает только тот антиген, к которому оно специфично, или относится к антителу, обладающему значительно более высокой аффинностью связывания с антигеном, к которому оно специфично (например, KLK5), по сравнению со связыванием с антигенами, к которым оно не специфично (такими как другие калликреины), например, по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз более высокой аффинностью связывания.

В одном варианте осуществления согласно настоящему изобретению связывание антитела с KLK5 характеризуется константой диссоциации ( $K_D$ ) примерно 500 пМ или менее, предпочтительно примерно 172 пМ.

Используемый в настоящем описании термин « $K_D$ » относится к константе диссоциации, которую получают из отношения  $K_d$  к  $K_a$  (т. е.  $K_d/K_a$ ) и выражают в виде

молярной концентрации (M).  $K_d$  и  $K_a$  относятся к скорости диссоциации и скорости ассоциации, соответственно, при конкретном взаимодействии антиген-антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент). Значения  $K_D$  для антител можно определить с использованием методов, хорошо известных в данной области. Способ определения  $K_D$  антитела заключается в использовании поверхностного плазмонного резонанса, такого как система Biacore®, например, как описано в примерах настоящего документа, с использованием рекомбинантного KLK5 или его подходящего слитого белка/полипептида. В одном примере аффинность измеряют с использованием рекомбинантного KLK5, как описано в настоящем документе в примерах. Для поверхностного плазмонного резонанса молекулы-мишени иммобилизуют на твердой подложке и экспонируют с лигандами в подвижной фазе, проходящей через проточную ячейку. Если происходит связывание лиганда с иммобилизованной мишенью, то изменяется локальный коэффициент преломления, приводя к изменению угла SPR, которое можно отследить в реальном времени путем детектирования изменений интенсивности отраженного света. Скорость изменения сигнала SPR можно проанализировать с получением констант кажущейся скорости фазы ассоциации и диссоциации реакции связывания. Отношение этих значений соответствует константе кажущегося равновесия (аффинность) (см., например, Wolff et al, Cancer Res. 53:2560-65 (1993)).

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет более высокую аффинность связывания (т. е. меньшую  $K_D$ ) для KLK5 человека, чем для KLK5 яванского макака или мыши. Термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антителом и KLK5.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет IC50 меньше 800 пМ для блокирования активности протеазы KLK5, предпочтительно, антитело по настоящему изобретению имеет IC50 меньше 18 пМ для блокирования активности протеазы KLK5 в анализе *in vitro*, как описан в настоящем документе.

Используемый в настоящем описании термин IC50 относится к половине максимальной ингибирующей концентрации, которая является мерой эффективности вещества, такого как антитело, в ингибировании конкретной биологической или биохимической функции, которой в настоящем изобретении является протеазная активность KLK5. IC50 представляет собой количественную меру, которая показывает, сколько определенного вещества необходимо для подавления данного биологического процесса, функции или активности наполовину.

Антитело по настоящему изобретению может содержать каркасные области животного, из которого было получено антитело. Например, если антитело получено у кролика, оно будет содержать CDR, как определено выше, и каркасные области кроличьего антитела, такого как антитело, содержащее переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 7 (последовательность нуклеотидов показана в SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 8) и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 9

(последовательность нуклеотидов показана в SEQ ID NO: 10).

В одном варианте осуществления антитело может быть химерным или гуманизированным антителом.

Химерные антитела обычно получают с использованием способов рекомбинантной ДНК. ДНК можно модифицировать путем замены кодирующей последовательности константных областей L- и H-цепи человека на соответствующие нечеловеческие (например, мышинные или кроличьи) константные области H- и L-цепи (Morrison; PNAS 81, 6851 (1984)).

Человеческие антитела содержат переменные области тяжелой или легкой цепи или полноразмерные тяжелые или легкие цепи, которые являются «продуктом» или «производными» конкретной последовательности зародышевой линии, если переменные области или полноразмерные цепи антитела получены из системы, которая использует гены иммуноглобулина зародышевой линии человека. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулина человека, интересующим антигеном или скрининг библиотеки генов иммуноглобулина человека, представленной на фаге, интересующим антигеном. Человеческое антитело или его фрагмент, которые являются «продуктом» или «производным» из последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, могут быть идентифицированы как таковые путем сравнения аминокислотной последовательности антитела человека с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и выбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, наиболее близкой по последовательности (т. е. с наибольшим % идентичности) к последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое является «продуктом» или «производным» конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать различия в аминокислотах по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, из-за встречающихся в природе соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленных мутаций. Однако выбранное человеческое антитело обычно по меньшей мере на 90% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют человеческое антитело как человеческое по сравнению с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательности зародышевой линии мыши). В некоторых случаях человеческое антитело может быть по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99% идентичным по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, человеческое антитело, полученное из конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет демонстрировать не более 10 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека.

В некоторых случаях человеческое антитело может отличаться не более чем на 5 или даже не более чем на 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

Человеческие антитела могут быть получены рядом способов, известных специалистам в данной области. Человеческие антитела могут быть получены гибридным методом с использованием линий клеток миеломы человека или гетеромиеломы мыши-человека (Kozbor, *J Immunol*; (1984) 133:3001; Brodeur, *Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications*, pp51-63, Marcel Dekker Inc., 1987). Альтернативные методы включают использование фаговых библиотек или трансгенных мышей, оба из которых используют репертуары переменных областей человека (Winter G; (1994) *Annu Rev Immunol* 12:433-455, Green LL, (1999) *J Immunol Methods* 231:1 1-23).

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению являются гуманизированными.

Антитела по настоящему изобретению могут быть получены с использованием любого подходящего метода, известного в данной области. KLK5, включая его слитые белки, клетки (рекомбинантно или естественным путем), экспрессирующие KLK5, можно использовать для получения антител, которые специфически распознают KLK5. Можно использовать различные формы KLK5, описанные в настоящем документе.

В одном варианте осуществления используемый антиген представляет собой активный KLK5, предпочтительно полученный, как описано в приведенных ниже примерах.

KLK5 или его фрагменты для применения для иммунизации хозяина могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники, из генетически сконструированных клеток-хозяев, содержащих системы экспрессии, или они могут быть выделены из природных биологических источников. KLK5 или его фрагмент могут в некоторых случаях быть частью более крупного белка, такого как слитый белок, например, слитый с аффинной меткой или подобным.

Антитела, генерированные против KLK5 по настоящему изобретению, могут быть получены, когда необходима иммунизация животного, путем введения KLK5 животному, предпочтительно не являющемуся человеком, с использованием хорошо известных и рутинных протоколов, см., например, *Handbook of Experimental Immunology*, DM Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Многие теплокровные животные, такие как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи могут быть иммунизированы. Однако наиболее подходящими являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области, таким как гибридный метод (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), метод триомы, метод гибридомы В-клеток человека (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72) и метод EBV-гибридомы (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Антитела для применения по изобретению также могут быть получены с использованием методов получения антител из одиночных лимфоцитов путем клонирования и экспрессии кДНК варибельной области иммуноглобулина, полученных из одиночных лимфоцитов, отобранных для продукции специфических антител, например, способами, описанными Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481; WO92/02551; WO2004/051268 и WO2004/106377.

Скрининг на антитела можно проводить с использованием анализов для измерения связывания с KLK5 и/или анализов для измерения ингибирования биологической активности KLK5, предпочтительно активности протеазы KLK5.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело представляет собой химерное или гуманизованное антитело; предпочтительно гуманизованное антитело; где антитело содержит варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где:

а. варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно, SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления согласно настоящему изобретению антитело, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51; где антитело содержит варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи и где:

а. варибельная цепь легкой цепи содержит:

i. CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно SEQ ID NO: 1;

ii. CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2 и

iii. CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. варибельную область тяжелой цепи, содержащую:

iv. CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4;

v. CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5 и

vi. CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6

где антитело представляет собой химерное или гуманизованное антитело; предпочтительно антитело представляет собой гуманизованное антитело.

В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное антитело, которое связывается с KLK5, содержит варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи и где:

а. варибельная цепь легкой цепи содержит:

i. CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно SEQ ID NO: 1;

ii. CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2 и

iii. CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. варибельную область тяжелой цепи, содержащую:

iv. CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4;

v. CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5 и

vi. CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6,

где антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и/или связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI; и/или не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI, или фрагментом LEKTI.

Более предпочтительно гуманизованное антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51; где антитело содержит варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи и где:

a. варибельная цепь легкой цепи содержит:

i. CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно SEQ ID NO: 1;

ii. CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2 и

iii. CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. варибельную область тяжелой цепи, содержащую:

i. CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4;

ii. CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5 и

iii. CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6,

где антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и/или связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI; и/или не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI, или фрагментом LEKTI.

Используемый в настоящем описании термин «гуманизованное» антитело относится к антителу, в котором тяжелая и/или легкая цепь содержит одну или более CDR (включая, если целесообразно, одну или более модифицированных CDR) донорного антитела (например, нечеловеческого антитела, такого как мышинное или кроличье моноклональное антитело), трансплантированных в каркасную область варибельной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, человеческого антитела). Для обзора см. Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одном варианте осуществления вместо переноса всей CDR в каркас человеческого антитела переносят только один или более определяющих специфичность остатков из любой из CDR, описанных в настоящем документе выше (см., например, Kashmiri et al., 2005,

Methods, 36, 25-34). В одном варианте осуществления в каркас человеческого антитела переносятся только определяющие специфичность остатки из одной или более CDR, описанных в настоящем документе выше. В другом варианте осуществления в каркас человеческого антитела переносятся только определяющие специфичность остатки из каждой из CDR, описанных в настоящем документе выше.

Когда CDR трансплантированы, можно использовать любую подходящую последовательность каркасной области акцепторной вариабельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого получены CDR, включая каркасные области мыши, примата и человека.

Предпочтительно, гуманизованное антитело по настоящему изобретению имеет вариабельный домен, содержащий акцепторные каркасные области человека, а также одну или более CDR, специально предусмотренных в настоящем документе. Таким образом, в одном варианте осуществления предложено блокирующее гуманизованное антитело, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, где вариабельный домен содержит каркасные области акцептора человека и CDR донора, отличного от человека.

Примерами человеческих каркасов, которые можно использовать в настоящем изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., см. выше). Например, KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, REI можно использовать для легкой цепи, а EU, LAY и POM можно использовать как для тяжелой, так и для легкой цепи. В качестве альтернативы можно использовать последовательности зародышевой линии человека; они доступны по адресу: <http://www.imgt.org/>

В гуманизованном антителе по настоящему изобретению тяжелая и легкая цепи акцептора не обязательно должны быть получены из одного и того же антитела и могут, при желании, содержать составные цепи, имеющие каркасные области, полученные из разных цепей.

Подходящая каркасная область для легкой цепи гуманизованного антитела по настоящему изобретению происходит из зародышевой линии человека IGKV1-6 JK4, имеющей SEQ ID NO: 47, нуклеотидная последовательность которой показана в SEQ ID NO: 48.

Подходящая каркасная область тяжелой цепи гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению происходит из зародышевой линии IGHV4-4 JH4 человека, имеющей последовательность SEQ ID NO: 49, и последовательность нуклеотидов которой показана в SEQ ID NO: 50.

Соответственно, в одном варианте осуществления предложено гуманизованное антитело, которое связывается с KLK5, где указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где:

- a. вариабельная цепь легкой цепи содержит:
  - i. CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно SEQ ID NO: 1; и
  - ii. CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2 и

- iii. CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и
- b. переменную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i. CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4; и
  - ii. CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5 и
  - iii. CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6,

где каркасная область легкой цепи происходит от зародышевой линии человека IGKV1-6 JK4, содержащей SEQ ID NO: 47; и каркасная область тяжелой цепи происходит от зародышевой линии человека IGHV4-4 JH4, содержащей SEQ ID NO: 49. Предпочтительно антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и/или связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI, или фрагментом LEKTI; и/или не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI, или фрагментом LEKTI.

В другом варианте осуществления предложено гуманизованное антитело, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51; где антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи и где:

- a. переменная цепь легкой цепи содержит:
  - i. CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно SEQ ID NO: 1; и
  - ii. CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2 и
  - iii. CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и
- b. переменную область тяжелой цепи, содержащую:
  - i. CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4; и
  - ii. CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5 и
  - iii. CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6,

где каркасная область легкой цепи происходит от зародышевой линии человека IGKV1-6 JK4, содержащей SEQ ID NO: 47; и каркасная область тяжелой цепи происходит от зародышевой линии человека IGHV4-4 JH4, содержащей SEQ ID NO: 49. Предпочтительно антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и/или связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI, или фрагментом LEKTI; и/или не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI, или фрагментом LEKTI; и

В гуманизованном антителе по настоящему изобретению каркасные области могут не иметь таких же точных последовательностей, как последовательности акцепторного антитела. Например, нетипичные остатки могут быть заменены на более часто встречающиеся остатки для класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях могут быть заменены так, чтобы они соответствовали остаткам, обнаруженным в том же положении в донорном антителе

(см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие замены следует поддерживать на минимальном необходимом уровне для получения аффинности донорного антитела. Протокол для выбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые, возможно, необходимо изменить, изложен в WO 91/09967 (которая включена сюда в качестве ссылки).

Таким образом, в одном варианте осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков в каркасе заменены альтернативным аминокислотным остатком.

Соответственно, в одном варианте осуществления предложено гуманизованное антитело по настоящему изобретению, в котором остатки в каждом из положений 2, и/или 3, и/или 63 вариательной области легкой цепи (применительно к SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 15) являются донорными остатками. Предпочтительно остаток в положении 2 вариательной области легкой цепи представляет собой тирозин, а остаток в положении 3 вариательной области легкой цепи представляет собой аспарагиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления остаток в положении 63 вариательной области легкой цепи представляет собой лизин.

В другом варианте осуществления предложено гуманизованное антитело, в котором по меньшей мере остатки в каждом из положений 68, 72, 74, 77 и 79 (применительно к SEQ ID NO: 49; или в положениях 67, 71, 73, 76 и 78 применительно к SEQ ID NO: 39) вариательной области тяжелой цепи являются донорными остатками.

Предпочтительно остаток в положении 72 вариательной области тяжелой цепи представляет собой глутамин, остаток в положении 74 представляет собой серин и остаток в положении 79 представляет собой валин. В некоторых вариантах осуществления остаток в положении 68 вариательной области тяжелой цепи представляет собой фенилаланин, и/или остаток в положении 77 представляет собой треонин.

В одном предпочтительном варианте гуманизованное антитело связывается с KLK5, где гуманизованное антитело содержит:

- вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11, или 15, или 19, или 23, и вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

- вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток в положении 24 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K), и вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39 или 43. Предпочтительно антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и/или связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI; и/или не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI, или фрагментом LEKTI.

В другом варианте осуществления предложено гуманизованное антитело, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51;

где антитело содержит:

- переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11, или 15, или 19, или 23, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

- переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток в положении 24 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K), и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39 или 43.

Предпочтительно антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и/или связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI; и/или не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI, или фрагментом LEKTI.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39.

Более предпочтительно, гуманизованное антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ. ID NO: 51; где антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39.

Еще более предпочтительно гуманизованное антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5 и/или связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI; и/или не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5 и/или образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI, или фрагментом LEKTI

В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу, содержащему последовательность, которая на 80% сходна или идентична последовательности, описанной в настоящем документе, например, на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по части или всей соответствующей последовательности, например, последовательности переменного домена, последовательности CDR или последовательности переменного домена, исключая CDR. В одном варианте осуществления релевантная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления соответствующая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления антитело, которое связывает KLK5, содержит легкую цепь и тяжелую цепь, где переменная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% или 99% идентичности или сходства с последовательностью, содержащейся в SEQ ID NO:15, и/или переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности или сходства с последовательностью, содержащейся в SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления антитело, которое связывает KLK5, содержит легкую цепь, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аналогична или идентична последовательности SEQ ID NO: 15, но где антитело имеет последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1 (или SEQ ID NO: 62 или 63) для CDR-L1, последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и последовательность, содержащая SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

Используемые в настоящем описании термины «идентичность», «идентичный» или их грамматические вариации указывают на то, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток идентичен между последовательностями. «Сходство», «сходный» или их грамматические вариации, используемые в настоящем документе, указывают на то, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток относится к сходному типу между последовательностями. Например, лейцин может быть заменен на изолейцин или валин. Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены на другие, включают, но не ограничиваются этим:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты с ароматическими боковыми цепями);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспартат и глутамат (аминокислоты с кислыми боковыми цепями);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты с амидными боковыми цепями); и
- цистеин и метионин (аминокислоты с серосодержащими боковыми цепями).

Степень идентичности и сходства можно легко рассчитать (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, программный пакет BLAST™, доступный от NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656,).

В одном варианте осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело, предпочтительно выбранное из IgG1 и IgG4 или IgG4P.

Таким образом, настоящее изобретение относится к полноразмерному гуманизованному антителу, которое связывает KLK5 и содержит:

- a. переменную область легкой цепи, содержащую:
  - i. CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1;
  - ii. CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2 и

- iii. CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и
- b. переменную область тяжелой цепи, содержащую:
- iv. CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4;
- v. CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5 и
- vi. CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Полноразмерное гуманизованное антитело предпочтительно связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, и где антитело представляет собой изоформу IgG4P.

В другом варианте осуществления предложено полноразмерное гуманизованное антитело, связывающееся с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, и где антитело представляет собой изоформу IgG4P.

Специалисту в данной области также будет понятно, что антитела могут подвергаться множеству посттрансляционных модификаций. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации в гликозилировании, окисление метионина, образование дикетопиперазина, изомеризацию аспартата и дезаминирование аспарагина. Частой модификацией является потеря С-концевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) благодаря действию карбоксипептидаз (как описано в Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Соответственно, С-концевой лизин тяжелой цепи может отсутствовать.

В одном варианте осуществления С-концевая аминокислота антитела отщепляется во время посттрансляционных модификаций.

В одном варианте осуществления N-концевая аминокислота антитела отщепляется во время посттрансляционных модификаций.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, представляет собой полноразмерное антитело, содержащее переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39. Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

В другом варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 41. Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138,

Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

Еще в одном варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент Fab', содержащий переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39.

В другом варианте осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43. Например, антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43, предпочтительно SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления аминокислота глутамин 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) Q24R или лизин (Lys; K) Q24K.

В другом варианте осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43. В другом варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент Fab', содержащий переменную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 11 и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43.

В другом варианте осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее переменную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 19 и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43. В другом варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент Fab', содержащий переменную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 19 и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43.

В другом варианте осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее переменную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 23 и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27 или 31, или 35, или 39, или 43.

В другом варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент Fab', содержащий переменную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 23 и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, или 31, или 35, или 39, или 43.

В другом варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее:

1. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45; или
2. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID

NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, где глутамин 24 (Gln; Q) представляет собой аргинин (Arg; R) Q24R или лизин (Lys; K) Q24K, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29 или 33, или 37, или 41, или 45; или

4. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 21, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45; или

5. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 41; где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51

Настоящее изобретение также относится к антителу, описанному выше, для образования комплекса с KLK5, предпочтительно KLK5 человека, связанного с другим антителом, где другое антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 68, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 70; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 72, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 73; и/или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76; и/или

3. переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 75, и переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 77.

В одном варианте осуществления антитело, которое связывает KLK5, где антитело предпочтительно связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43;

где антитело образует комплекс с KLK5, предпочтительно KLK5 человека, связанным с другим антителом, где другое антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 68, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 70; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 72, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 73; и/или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76; и/или

3. переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 75, и переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 77.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к антителу, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, которое содержит:

1. переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 68, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 70; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 72, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 73; где антитело необязательно является гуманизированным; и/или 2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76; и/или

3. переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 75, и переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 77.

Кроме того, настоящее изобретение также включает комплекс KLK5-антитело, содержащий:

a. KLK5, предпочтительно KLK5 человека; и

b. антитело, которое связывает KLK5, где антитело предпочтительно связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, где указанное антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27,

или 31, или 35, или 39, или 43; и

а. другое антитело, которое содержит:

1. переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 68, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 70; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 72, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 73; где антитело необязательно является гуманизированным; и/или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76; и/или

3. переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 75, и переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 77.

Следует понимать, что так называемое «другое антитело» связывается с KLK5, предпочтительно KLK5 человека, с эпитопом, который отличается от описанного здесь эпитопа и не перекрывается с ним (и содержит аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51), как показано в приведенных ниже примерах. В этом отношении такие антитела не конкурируют друг с другом.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к антителу, которое конкурирует за связывание KLK5, предпочтительно KLK5 человека, путем перекрестного блокирования или будучи перекрестно блокируемым антителом, которое связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, и такое антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15,

или 19, или 23; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамин 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

В одном варианте осуществления такое конкурирующее антитело имеет вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности или сходства с последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 29 или 33, или 37, или 41, или 45; и/или имеет вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности или сходства с последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, или 30.

Конкурирующие антитела могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего метода в данной области, например, с использованием конкурентных анализов ИФА или ВІАcore, где связывание KLK5 конкурирующим антителом путем перекрестного блокирования или будучи перекрестно блокированным предотвращает связывание антитела по настоящему изобретению или наоборот. В таких конкурирующих анализах можно использовать выделенный природный или рекомбинантный KLK5 или его подходящий слитый белок/полипептид. В одном примере конкуренцию измеряют с использованием рекомбинантного активного KLK5 человека (например, содержащего SEQ ID NO: 53).

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты содержат кислотные и/или основные функциональные группы, придавая таким образом молекуле суммарный положительный или отрицательный заряд. Величина общего «наблюдаемого» заряда будет зависеть от абсолютной аминокислотной последовательности объекта, локального окружения заряженных групп в трехмерной структуре и условий окружения молекулы. Изoeлектрическая точка (pI) представляет собой pH, при котором конкретная молекула или ее поверхность, доступная для растворителя, не несет суммарного электрического заряда. В одном примере антитело, связывающее KLK5, которое связывается с эпитопом KLK5 человека, включающим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они имели подходящую изoeлектрическую точку. Это может привести к получению антител с более устойчивыми свойствами, в частности, с подходящими профилями растворимости и/или стабильности и/или улучшенными характеристиками очистки.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к антителу, связывающему KLK5, которое предпочтительно связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138,

Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, где антитело содержит:

а. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

б. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25; и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45;

которое сконструировано так, чтобы иметь изоэлектрическую точку, отличную от изоэлектрической точки исходного идентифицированного антитела.

Антитело может, например, быть сконструировано путем замены аминокислотного остатка, такой как замена аминокислотного остатка на один или более основных аминокислотных остатков. Альтернативно, основные аминокислотные остатки могут вводиться или кислотные аминокислотные остатки могут удаляться. В качестве альтернативы, если молекула имеет неприемлемо высокое значение pI, при необходимости могут быть введены кислотные остатки для снижения pI. Важно, что при манипулировании pI необходимо соблюдать осторожность, чтобы сохранить желаемую активность антитела или его фрагмента. Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированное антитело обладает такой же или по существу такой же активностью, что и «немодифицированное» антитело или его фрагмент.

Такие программы, как \*\*ExpASY [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) и [http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d\\_abim/compo-p.html](http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html), могут использоваться для предсказания изоэлектрической точки антитела.

Понятно, что аффинность антител, предложенных настоящим изобретением, может изменяться с использованием подходящего метода, известного в данной области. Таким образом, настоящее изобретение также относится к вариантам антитела, обладающим повышенной аффинностью к KLK5, в частности к KLK5 человека. Такие варианты можно получить с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включая мутацию CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), использование штаммов-мутаторов *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), перетасовку ДНК (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) и ПЦР с иммитацией генетической рекомбинации («sexual PCR») (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998).

При желании антитело по настоящему изобретению может быть конъюгировано с одной или более эффекторными молекулами. Понятно, что эффекторная молекула может включать единственную эффекторную молекулу или две или более таких молекул, связанных с образованием единственного фрагмента, который может быть присоединен к антителам по настоящему изобретению. В случае, если целесообразно получение фрагмента антитела, связанного с эффекторной молекулой, то это можно получить с помощью стандартных химических процедур или методов рекомбинантной ДНК, так что

фрагмент антитела будет связан с эффекторной молекулой либо прямо, либо посредством агента конденсации. Способы конъюгации таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см. Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, что описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, в случае где эффекторная молекула является белком или полипептидом, связь может достигаться с использованием методов рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP0392745.

Используемый в настоящем описании термин «эффекторная молекула» включает, например, противоопухолевые агенты, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например, ферменты, другое антитело или фрагменты антитела, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например, ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, особенно радиоактивный йод, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые могут детектироваться с помощью ЯМР или ЭПР спектроскопии.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические агенты, включая любой агент, который наносит вред (например, убивает) клетки. Примеры включают комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, халихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомин, этопосид, тенопосид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидрокси антрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы также включают, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиоэпа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфид, дибромоманнитол, стрептозотозин, митомин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как  $^{111}\text{In}$  и  $^{90}\text{Y}$ ,  $\text{Lu}^{177}$ , висмут $^{213}$ , калифорний $^{252}$ , иридий $^{192}$  и вольфрам $^{188}$ /рений $^{188}$ ; или лекарственные средства, такие как, но не ограничиваясь ими, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Ферменты,

представляющие интерес, включают, в частности, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Интересующие белки, полипептиды и пептиды включают, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли,  $\alpha$ -интерферон,  $\beta$ -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромботический агент или антиангиогенный агент, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцит-макрофагколониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитколониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другие факторы роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, используемые, например, в диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные нуклиды, позитронно-активные металлы (для использования в позитрон-эмиссионной томографии), и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. См., в основном, патент США No. 4741900 для ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для применения в качестве диагностических средств. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радиоактивные нуклиды включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{99}\text{Tc}$ .

В другом примере эффекторная молекула может увеличивать время полужизни антитела *in vivo* и/или снижать иммуногенность антитела и/или усиливать доставку антитела через эпителиальный барьер к иммунной системе. Примеры подходящих эффекторных молекул данного типа включают полимеры, альбумин, альбумин-связывающие белки или альбумин-связывающие соединения, такие как те, что описаны в WO05/117984.

В случае, где эффекторная молекула является полимером, она, в общем случае, может быть синтетическим или природным полимером, например, необязательно замещенной неразветвленной или разветвленной полиалкиленовой цепью, полиалкиленовым или полиоксиалкиленовым полимером или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например, гомо- или гетерополисахаридом.

Специфические необязательные заместители, которые могут присутствовать в вышеописанных синтетических полимерах, включают одну или более гидроксильных, метильных или метокси групп.

Специфические примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенные неразветвленные или разветвленные цепи поли(этиленгликоля), поли(пропиленгликоля), поли(винилового спирта) или их производные, особенно необязательно замещенные поли(этиленгликоли), такие как метоксиполи(этиленгликоль) или их производные.

Специфические природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гикоген или их производные.

В одном варианте осуществления полимер представляет собой альбумин или его фрагмент, такой как сывороточный альбумин человека или его фрагмент.

Термин «производные», используемый в настоящем описании, включает реакционноспособные производные, например тиол-селективные реакционноспособные группы, такие как малеимиды и т. п. Реактивная группа может быть связана непосредственно с полимером или посредством линкерного сегмента. Понятно, что остаток такой группы будет в некоторых случаях образовывать часть продукта в виде связывающей группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера может варьироваться по желанию, но обычно он находится в диапазоне средней молекулярной массы от 500 до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да, например, от 20000 до 40000 Да. Размер полимера, конкретно, может быть выбран на основе назначенного применения продукта, например, по способности к локализации в определенных тканях, таких как опухоли, или благодаря повышенному периоду полужизни в кровотоке (для обзора см. Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, например, когда продукт предназначен для выхода из кровотока и проникновения в ткани, например, для использования при лечении опухоли, может быть выгодно использовать полимер с низкой молекулярной массой, например, с молекулярной массой около 5000 Да. Для таких применений, где продукт остается в кровотоке, может быть предпочтительным использование полимера с более высокой молекулярной массой, например, в диапазоне от 20000 Да до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, особенно, метоксиполи(этиленгликоль) или их производные, и особенно с молекулярной массой в диапазоне примерно от 15000 Да примерно до 40000 Да.

В одном примере антитело по настоящему изобретению присоединено к фрагментам поли(этиленгликоля) (PEG). В одном конкретном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению и молекулы ПЭГ могут быть присоединены через любую доступную боковую цепь аминокислоты или концевую аминокислотную функциональную группу, расположенную во фрагменте антитела, например любую свободную амино-, имино-, тиольную, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться в природе во фрагменте антитела или могут быть сконструированы в антителе с использованием способов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США 5219996; патент США 5667425; WO98/25971, WO2008/038024). В

одном примере антитело по настоящему изобретению представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, где модификация представляет собой добавление к С-концу его тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот для обеспечения возможности присоединения эффекторной молекулы. Соответственно, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Множество сайтов может использоваться для присоединения двух или более молекул ПЭГ.

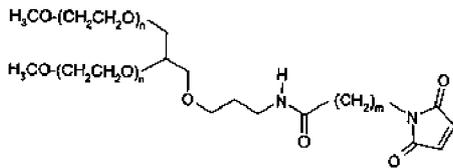
Соответственно, молекулы ПЭГ ковалентно связаны посредством тиольной группы по меньшей мере одного остатка цистеина, локализованного во фрагменте антитела. Каждая полимерная молекула, присоединенная к модифицированному фрагменту антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы остатка цистеина, локализованного во фрагменте. Ковалентная связь, как правило, представляет собой дисульфидную связь, конкретно, связь сера-углерод. В случае использования тиольной группы в качестве точки присоединения соответственно активированных эффекторных молекул, могут использоваться, например, тиольные селективные производные, такие как малеимиды и производные цистеина. Активированный полимер может использоваться в качестве исходного материала при получении полимер-модифицированных антительных фрагментов, как описано выше. Активированный полимер может представлять собой любой полимер, содержащий реакционноспособную тиоловую группу, такую как  $\alpha$ -галогенкарбоновая кислота или сложный эфир, например, йодацетамид, имид, т.е. малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы могут быть получены коммерчески (например, из Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Хантсвилл, Алабама, США) или могут быть получены из коммерчески доступных исходных материалов с использованием стандартных химических процедур. Конкретные ПЭГ-молекулы включают 20К метокси-ПЭГ-амин (получаемый из Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и M-PEG-SPA (получаемый из Nektar, ранее Shearwater).

В одном варианте осуществления антитело представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или diFab, который пегилирован, т.е. к нему ковалентно присоединен ПЭГ (поли(этиленгликоль)), например, в соответствии со способом, раскрытым в EP 0948544 или EP 1090037 (см. также «Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications», 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, «Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications», 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and «Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences», 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545). В одном примере, ПЭГ присоединяют к цистеину в шарнирном участке. В одном примере, Fab-фрагмент, модифицированный с помощью ПЭГ, содержит малеимидную группу, ковалентно связанную с единственной тиольной группой в модифицированном шарнирном участке. Остаток лизина может быть ковалентно связан с малеимидной

группой, и к каждой из аминокрупп на остатке лизина может быть присоединен полимер метоксиполи(этиленгликоль), имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Суммарная молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab-фрагменту, может, таким образом, составлять приблизительно 40000 Да.

Конкретные молекулы ПЭГ включают лизин, модифицированный с помощью 2-[3-(N-малеимид)пропионамид]этиламин N, N'-bis(метоксиполи(этиленгликоля) MW 20000), также известный как PEG2MAL40K (получаемый из Nektar, ранее Shearwater).

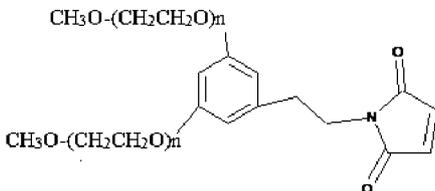
Альтернативные источники ПЭГ-линкеров включают NOF, которые поставляют GL2-400MA3 (где m в структуре ниже составляет 5) и GL2-400MA (где m составляет 2), и n составляет приблизительно 450:



m = 2 или 5

Таким образом, в одном варианте осуществления ПЭГ представляет собой 2,3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-[[3-(6-малеимида-1-оксогексил)амино]пропилокси]гексан (разветвленный на две ветви ПЭГ, -CH<sub>2</sub>) 3NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-MAL, Mw 40000, известный как SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Дополнительные эффекторные молекулы ПЭГ следующего типа:



доступны из Dr Reddy, NOF и Jenkem.

В одном варианте осуществления Fab или Fab' по настоящему изобретению конъюгированы с молекулой ПЭГ.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается молекула Fab'ПЭГ, содержащая один или более полимеров ПЭГ, например, 1 или 2 полимера, такие как полимер 40кДа или полимеры.

Молекулы Fab'-ПЭГ согласно настоящему изобретению могут быть особенно предпочтительными из-за того, что их период полужизни не зависит от Fc-фрагмента. В одном варианте осуществления, предложен Fab', конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина. В одном варианте осуществления предложен scFv, конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина. В одном варианте осуществления Fab или Fab' согласно настоящему изобретению конъюгирован с сывороточным альбумином человека. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент конъюгировано с

молекулой крахмала, например, для увеличения периода полужизни. Методы конъюгации крахмала с белком описаны в US 8017739, который включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему антитело по настоящему изобретению. Выделенный полинуклеотид по настоящему изобретению может содержать синтетическую ДНК, например, полученную путем химической обработки, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих антитело по настоящему изобретению, можно использовать стандартные методы молекулярной биологии. Желаемые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости могут использоваться методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В одном варианте осуществления выделенный полинуклеотид по изобретению кодирует:

- a. переменную область легкой цепи, где полинуклеотид:
  - i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или
  - ii. содержит SEQ ID NO: 8 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или
  - iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидов 1-330 SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидов 1-330 SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66;
- b. переменную область тяжелой цепи, где полинуклеотид:
  - i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или
  - ii. содержит SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или
  - iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44;
- c. легкую цепь, где полинуклеотид:
  - i. по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или
  - ii. содержит SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или
  - iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104;
- d. тяжелую цепь, где полинуклеотид:
  - i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или
  - ii. содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или
  - iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему тяжелую цепь Fab'-фрагмента антитела или антитела IgG1 или IgG4 по настоящему изобретению, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, или 28, или 32, или 36, или 40 или 44. Также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь Fab'-фрагмента антитела или антитела IgG1 или IgG4 по настоящему изобретению, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8 (или нуклеотиды 1-330 в SEQ ID NO: 8) или 12 (или нуклеотиды 1-330 SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему тяжелую цепь и легкую цепь антитела IgG4(P) по настоящему изобретению, в котором полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:30 или 34. или 38, или 42, или 46, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104.

Настоящее изобретение также относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему один или более описанных здесь полинуклеотидов. В одном примере клонирующий или экспрессирующий вектор по настоящему изобретению содержит один или более выделенных полинуклеотидов, содержащих последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104, или 30 или 34 или 38 или 42 или 46.

Общие методы, с помощью которых могут быть сконструированы векторы, методы трансфекции и культуральные методы также известны специалистам в данной области. В этом отношении сделана ссылка на «Current Protocols in Molecular Biology», 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

Также предложена клетка-хозяин, содержащая одну или более выделенных полинуклеотидных последовательностей по изобретению или один или более клонирующих или экспрессирующих векторов, содержащих одну или более выделенных полинуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело по настоящему изобретению. Любая подходящая система клетка-хозяин/вектор может быть использована для экспрессии полинуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело по настоящему изобретению. Могут быть использованы бактериальные, например *E.coli*, и другие микробные системы, или также могут быть использованы эукариотические, например млекопитающих, системы экспрессии клеток-хозяев. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают клетки CHO, миеломные или гибридомные клетки.

Подходящие типы клеток яичников китайского хомячка (клетки CHO) для использования в настоящем изобретении могут включать клетки CHO и CHO-K1, включая клетки dhfr-CHO, такие как клетки CHO-DG44 и клетки CHO-DXB11, которые можно использовать с маркером селекции DHFR, или клетки CHOK1-SV, которые можно

использовать с маркером селекции глутаминсинтетазой. Другие типы клеток для использования в экспрессии антител, включают лимфоцитарные клеточные линии, например, миеломные клетки NSO и клетки SP2, клетки COS. Клетка-хозяин может быть стабильно трансформирована или трансфицирована выделенными полинуклеотидными последовательностями или экспрессирующими векторами согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой клетку CHO-DG44, стабильно трансфицированную экспрессирующими векторами, содержащими выделенные полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению, предпочтительно содержащими выделенные полинуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 8 (или нуклеотиды 1-330 SEQ ID NO: 8), 10, 12 (или нуклеотиды 1-330 SEQ ID NO: 12), 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 64, 65, 66, 67, 100, 101, 102, 103 или 104.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, связывающего KLK5, по настоящему изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, подходящих для продукции антитела, и выделение полученного таким образом антитела.

Антитело может содержать только тяжелую или легкую цепь, и в этом случае для трансфекции клеток-хозяев необходимо использовать только полинуклеотидную последовательность тяжелой или легкой цепи. Для получения антител, содержащих как тяжелую, так и легкую цепи, клеточную линию можно трансфицировать двумя векторами: первым вектором, кодирующим легкую цепь, и вторым вектором, кодирующим тяжелую цепь. В качестве альтернативы можно использовать один вектор, содержащий полинуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь.

Таким образом, предложен способ культивирования клетки-хозяина и экспрессии антитела, выделения последнего и, необязательно, его очистки для получения выделенного антитела. Таким образом, в одном варианте осуществления предложено выделенное антитело, связывающее KLK5, предпочтительно KLK5 человека, такое как гуманизованное антитело, в частности антитело по изобретению, по существу очищенное, в частности свободное или по существу свободное от эндотоксина и/или белка или ДНК клетки-хозяина, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная

область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамин 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

В другом варианте осуществления предложено выделенное антитело, связывающее KLK5, предпочтительно KLK5 человека, такое как гуманизированное антитело, в частности антитело по изобретению, по существу очищенное, в частности свободное или по существу свободное от эндотоксина и/или белка или ДНК клетки-хозяина, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, и где указанное антитело содержит:

1. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15,

или 19, или 23; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамина 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Подразумевается, что «по существу свободный от эндотоксина», как правило, относится к содержанию эндотоксина 1 EU на 1 мг продукта антитела или менее, как например, 0,5 или 0,1 EU на 1 мг продукта.

Подразумевается, что «по существу свободный от белка или от ДНК клетки-хозяина», как правило, относится к содержанию белка клетки-хозяина и/или ДНК, составляющему 400мкг на 1 мг продукта антитела или менее, как например, 100мкг на 1мг или менее, конкретно, 20мкг на 1мг, соответственно.

Поскольку антитела по настоящему изобретению применимы при лечении, диагностике и/или профилактике патологического состояния, настоящее изобретение также относится к фармацевтической или диагностической композиции, содержащей антитело по настоящему изобретению в комбинации с одним или более из фармацевтически приемлемого носителя, вспомогательного вещества или разбавителя.

Предпочтительно фармацевтическая или диагностическая композиция содержит антитело, которое связывается с KLK5, предпочтительно с KLK5 человека, где антитело содержит:

1. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27,

или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамина 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению является единственным активным ингредиентом. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению находится в комбинации с одним или более дополнительными активными ингредиентами. Альтернативно, фармацевтические композиции содержат антитело по настоящему изобретению, которое является единственным активным ингредиентом, и его можно вводить индивидуально пациенту в комбинации (например, одновременно, последовательно или отдельно) с другими терапевтическими, диагностическими или паллиативными агентами.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, связывающее KLK5, предпочтительно KLK5 человека, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где

аминокислотный остаток глутамина 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

б. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45;

и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей.

Предпочтительно фармацевтическая композиция, содержащая антитело, которое связывается с KLK5, связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51. Более предпочтительно фармацевтическая композиция, содержащая антитело, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, и это антитело содержит переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 15 и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 39.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить пациенту соответствующим образом для определения необходимого терапевтически эффективного количества. Используемый в настоящем описании термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтического агента, которое необходимо для лечения, ослабления или предотвращения целевого заболевания или патологического состояния, или для демонстрации детектируемого или превентивного эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество может оцениваться исходно либо в культуральных анализах или в животных моделях, обычно грызунов, кроликов, собак, свиней или приматов. Животная модель также может использоваться для определения соответствующего диапазона концентрации и пути введения. Такая информация может затем использоваться для определения полезных доз и путей введения людям.

Точное терапевтически эффективное количество для объекта-человека будет зависеть от тяжести болезненного состояния, общего состояния здоровья пациента, возраста, массы тела и пола пациента, диеты, времени и частоты введения, лекарственной комбинации(й), чувствительности реакции и восприимчивости/ответа на терапию. Как правило, терапевтически эффективное количество составляет от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, например, от 0,1 мг/кг до 200 мг/кг, например, 100 мг/кг. Фармацевтические композиции могут быть представлены стандартным образом в единичных лекарственных формах, содержащих определенное количество активного агента по изобретению на одну дозу.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Дополнительно, в такой композиции могут присутствовать вспомогательные

вещества, такие как увлажнители или эмульгаторы или регулирующие pH буферные вещества. Такие носители дают возможность фармацевтическим композициям быть приготовленными в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, густых суспензий и суспензий для потребления пациентом.

Подходящие формы для введения включают формы, подходящие для парентерального введения, например, инъекцией или инфузией, например, болюсной инъекцией или непрерывной инфузией, внутривенной, ингаляционной или подкожной формой. Если продукт предназначен для инъекций или инфузий, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе и может содержать составные агенты, такие как суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В качестве альтернативы, антитело по изобретению может быть в сухой форме для восстановления перед использованием с соответствующей стерильной жидкостью. Также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспензии в жидких носителях перед инъекцией.

После смешивания композиции по изобретению можно вводить непосредственно пациенту. Соответственно, в настоящем документе предусмотрено применение антитела по изобретению для изготовления лекарственного средства.

Предпочтительно фармацевтическая композиция по настоящему изобретению адаптирована для введения человеку.

Следовательно, в другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с KLK5, где антитело или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, для применения в терапии, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамин 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

В предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, для применения в терапии, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 41.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51 или фармацевтическую композицию, содержащую антитело, для применения в терапии, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID

NO: 41

В частности, применение в терапии включает применение при лечении одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5 у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с KLK5, или фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамина 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения одного или более заболеваний, характеризующихся

нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5 у пациента, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело содержит:

1. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 41.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

В другом аспекте антитело, которое связывается с KLK5, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, где указанное антитело предназначено для применения при лечении одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, где указанное антитело содержит:

1. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамина 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, где указанное антитело предназначено для применения при лечении одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, где указанное антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 41.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

Предпочтительно одно или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, выбирают из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря или их комбинации.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации, у пациента, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с KLK5, или фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где

вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1 со, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамина 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

Более предпочтительно способ предназначен для лечения синдрома Нетертона и/или атопического дерматита.

В другом аспекте предложено антитело, которое связывается с KLK5, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, где антитело предназначено для применения при лечении синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря или их комбинация, и где антитело содержит:

1. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где

вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамин 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

Более предпочтительно, антитело предназначено для лечения синдрома Нетертона и/или атопического дерматита.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации, у пациента, причем способ включает введение указанному пациенту терапевтически эффективное количество антитела, которое связывается с KLK5, или фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело содержит:

1. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 41.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

Более предпочтительно способ предназначен для лечения синдрома Нетертона и/или атопического дерматита.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, которое связывается с KLK5, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, предназначены для применения при лечении синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации, где антитело содержит:

1. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 41.

Предпочтительно антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147, применительно к SEQ ID NO: 51.

Более предпочтительно, антитело предназначено для лечения синдрома Нетертона и/или атопического дерматита.

Настоящее изобретение также относится к антителу, которое связывается с KLK5, или к фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело предназначено для применения при лечении синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинация, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

Также настоящее изобретение относится к способу лечения синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации, у пациента, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с KLK5, или фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим

аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, или фармацевтической композиции, содержащей антитело, для изготовления лекарственного средства для лечения одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, где такое нарушение регуляции предпочтительно представляет собой синдром Нетертона, атопический дерматит, ихтиоз, розацеа, астму или онкологическое заболевание, такое как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинация, более предпочтительно синдром Нетертона и/или атопический дерматит.

В частности, изобретение также относится к применению антитела, которое связывается с KLK5, где антитело предпочтительно связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, или к фармацевтической композиции, содержащей антитело, для изготовления лекарственного средства для лечения одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, где такое нарушение регуляции предпочтительно представляет собой синдром Нетертона, атопический дерматит, ихтиоз, розацеа, астму или онкологическое заболевание, такое как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинация, более предпочтительно синдром Нетертона и/или атопический дерматит, где антитело содержит:

1. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2,

содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамин 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141., His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51 в качестве диагностически активных агентов или в диагностических анализах, например, для диагностики синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или мочевого пузыря.

Более предпочтительно антитело содержит:

1. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамин 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и варибельную область тяжелой

цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

б. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Диагностика предпочтительно может быть выполнена на биологических образцах. «Биологический образец» охватывает множество типов образцов, полученных от индивидуума, и может быть использован в диагностическом или контрольном анализе. Определение охватывает кровь, такую как плазма и сыворотка, и другие жидкие образцы биологического происхождения, такие как моча и слюна, спинномозговая жидкость, образцы твердых тканей, такие как образец биопсии, такой как биопсия кожи или культуры тканей или полученные из них клетки и их потомство. Это определение также включает образцы, которые подверглись каким-либо манипуляциям после их получения, например, путем обработки реагентами, солюбилизации или обогащения определенными компонентами, такими как полинуклеотиды.

Диагностическое тестирование предпочтительно можно проводить на биологических образцах, которые не контактируют с телом человека или животного. Такое диагностическое тестирование также называется тестированием *in vitro*. Диагностическое тестирование *in vitro* может основываться на способе детектирования KLK5 *in vitro* в биологическом образце, полученном от индивидуума, включающем следующие стадии: i) приведение биологического образца в контакт с антителом, как описано в настоящем документе; и ii) детектирование связывания антитела с KLK5. Путем сравнения детектируемого уровня KLK5 или наличия конкретной посттрансляционно модифицированной формы KLK5 (включая любую проформу) с подходящим контролем можно идентифицировать одно или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5. Таким образом, такой метод детектирования можно использовать для определения того, имеет ли пациент (включая эмбрион или плод) или подвержен ли он риску развития заболевания, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с KLK5, где антитело предпочтительно связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51, где антитело предназначено для применения при диагностике одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, предпочтительно при диагностике синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такой как рак яичников или рак мочевого пузыря, где антитело содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-

L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

2. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

4. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

5. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, где аминокислотный остаток глутамина 24 (Gln; Q) применительно к SEQ ID NO: 15 представляет собой аргинин (Arg; R) или лизин (Lys; K); и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43; или

6. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Таким образом, настоящее изобретение относится к следующим вариантам осуществления:

Вариант осуществления 1: антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где указанное антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 2: антитело в соответствии с вариантом осуществления 1, где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 3: антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим

аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

Вариант осуществления 4: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 3, где эпитоп охарактеризован с помощью рентгеноструктурного анализа.

Вариант осуществления 5: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-4, где антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5.

Вариант осуществления 6: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-5, где антитело связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI.

Вариант осуществления 7: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где антитело не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5.

Вариант осуществления 8: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, где антитело образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI.

Вариант осуществления 9: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 6-8, где фрагмент LEKTI представляет собой домен LEKTI 5 человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 54, или домен LEKTI 8, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 61.

Вариант осуществления 10: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело связывается с KLK5 человека, предпочтительно с KLK5 человека, содержащим SEQ ID NO: 53, и KLK5 яванского макака (суно), предпочтительно с суно KLK5, содержащим SEQ ID NO: 60.

Вариант осуществления 11: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело не связывается с калликреином 2 человека или яванского макака (KLK2); или калликреином 4 человека или яванского макака (KLK4); или калликреином 7 человека или яванского макака (KLK7).

Вариант осуществления 12: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 3-11, где антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

а. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 13: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело представляет собой химерное или гуманизованное антитело.

Вариант осуществления 14: Антитело в соответствии с любым из предыдущих

вариантов осуществления, где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

Вариант осуществления 15: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 13, где полноразмерное антитело выбирают из IgG1, IgG4 или IgG4P.

Вариант осуществления 16: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-13, где антитело выбирают из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dAb или VHH.

Вариант осуществления 17: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-16, где антитело содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и/или

b. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43.

Вариант осуществления 18: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-15 или 17, где антитело содержит:

a. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25; и

b. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

Вариант осуществления 19: Антитело в соответствии с вариантами осуществления 17 или 18, где аминокислотный остаток глутамина (Gln; Q) в L-CDR1 в положении 24 применительно к SEQ ID NO: 15 или 17 заменен аргинином (Arg; R) или лизином (Lys; K).

Вариант осуществления 20: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где KLK5 представляет собой KLK5 человека, содержащий SEQ ID NO: 51, или 52, или 53, или супо KLK5, содержащий SEQ ID NO: 60.

Вариант осуществления 21: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело образует комплекс с KLK5, предпочтительно KLK5 человека, связанным с другим антителом, которое содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 68, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 70; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 72, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 73; и/или

b. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76; и/или

c. переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 75, и переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 77.

Вариант осуществления 22: антитело, связывающееся с KLK5, предпочтительно, с KLK5 человека, где антитело содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 68, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 70; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 72, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 73; и/или

b. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76; и/или

с. вариабельную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 75, и вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 77.

Вариант осуществления 23: Комплекс KLK5-антитело, содержащий:

- a. KLK5, предпочтительно KLK5 человека
- b. антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18 и
- c. антитело в соответствии с вариантами осуществления 19 или вариантами осуществления 20.

Вариант осуществления 24: Антитело, которое:

- a. Конкурирует за связывание KLK5 с антителом в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20; и/или
- b. перекрестно блокирует или перекрестно блокируется антителом в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 для связывания KLK5; и/или
- c. связывается с KLK5 с тем же эпитопом, что и антитело, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20; и/или
- d. содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45; и/или
- e. содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25.

Вариант осуществления 25: выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20.

Вариант осуществления 26: выделенный полинуклеотид в соответствии с вариантом 25, где полинуклеотид кодирует:

- a. вариабельную область легкой цепи, где полинуклеотид:
  - i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66 ; или
  - ii. содержит SEQ ID NO: 8 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или
  - iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидов 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидов 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или
- b. вариабельную область тяжелой цепи, где полинуклеотид:
  - i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или
  - ii. содержит SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или
  - iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или

или

с. легкую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

ii. содержит SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

d. тяжелую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или

ii. содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46.

Вариант осуществления 27: клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий один или более полинуклеотидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 25 или 26.

Вариант осуществления 28: клетка-хозяин, содержащая:

a. один или более полинуклеотидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 25 или 26 или

b. один или более экспрессирующих векторов в соответствии с вариантом осуществления 27.

Вариант осуществления 29: Способ получения антитела в соответствии с любым из вариантов воплощения 1-20, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с вариантом осуществления 28 в подходящих условиях для продукции антитела и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

Вариант осуществления 30: Фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей.

Вариант осуществления 31: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-20 или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 30 для применения в терапии.

Вариант осуществления 32: антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 30 для применения при лечении заболевания, характеризующегося нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

Вариант осуществления 33: антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 32, где заболевание выбрано из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или рака, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации.

Вариант осуществления 34: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 33, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

Вариант осуществления 35: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 33, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

Вариант осуществления 36: Способ лечения заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5 у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 или фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления 30.

Вариант осуществления 37: Способ в соответствии с вариантом осуществления 34, где заболевание выбрано из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря.

Вариант осуществления 38: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 35, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

Вариант осуществления 39: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 35, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

Вариант осуществления 40: антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 30 для изготовления лекарственного средства для лечения одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

Вариант осуществления 41: антитело для изготовления в соответствии с вариантом осуществления 40, где заболевание выбрано из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации.

Вариант осуществления 42: антитело для изготовления в соответствии с вариантом осуществления 40, где заболевание выбрано из синдрома Нетертона или атопического дерматита или их комбинации.

Вариант осуществления 43: антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20 для применения в качестве диагностического средства или для применения в диагностическом анализе или диагностическом наборе для диагностики одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

Вариант осуществления 44: антитело в соответствии с вариантом осуществления 43, где заболевание выбрано из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации.

Последовательности, включенные в настоящее изобретение, показаны в Таблице 1:

Таблица 1

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДВАТЕЛЬНОСТЬ |
|----------|------------|-------------------|
|----------|------------|-------------------|

|  |    |  |
|--|----|--|
| <b>CDR-L1</b>                              | 1  | QASQSISWLA   |
| <b>CDR-L2</b>                              | 2  | LASTLAS  |
| <b>CDR-L3</b>                              | 3  | QQGYTNSNIINT   |
| <b>CDR-H1</b>                              | 4  | GFPLSNYAMS   |
| <b>CDR-H2</b>                              | 5  | DIYPSDIIDYASWAKG   |
| <b>CDR-H3</b>                              | 6  | DNNDYGLDI  |
| <b>Rabbit VL</b>                           | 7  | AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISWLAWYQQKPG<br>QPPKLLIYLASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVECADAA<br>TYCQQGYTNSNIINTFGGGTEVVVK  |
| <b>VL кролика<br/>нукл.</b>                | 8  | gcctatgatagaccagactccagcctctgtggaggtagctgtgggaggcacagtcaccatcaa<br>gtgccaggccagtcagagcattagcagttggttagcctggatcagcagaaccaggcagcctc<br>ccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctggggtctcatcgcggtcaaggcagtg<br>gatctgggacacagttcactctcaccatcagggcgtggagtgtgccgatctgccactactact<br>gtcaacagggttataactaataatattattaataactttcggcggaggaccaggtggtggtcaa<br>acgtacg  |
| <b>VH кролика</b>                          | 9  | QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFPLSNYAMSWVRQAPGK<br>GLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQTSTVELKITGPTTED<br>TATYFCARDNNDYGLDIWGPGLVTVSS  |
| <b>VH кролика<br/>нукл.</b>                | 10 | cagtcggtggaggagtcggggggtcgcctggcagcctgggacaccctgacactcacctgc<br>accgtctctgggttccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgccaggctccaggaaggg<br>gctggaatgatcggagacattatcctagtatgatcatagactacgcgagctgggcgaaagcc<br>gattaccatctccaaacctcaccacgggtggagctgaaaatcacgggtccgacaaccgagga<br>cacggccactattctgtgccagagacaacaatgactatggtctggacatctggggcccaggca<br>ccctggtcaccgtctcagat  |
| <b>10236 gL5<br/>VL</b>                    | 11 | AYDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISWLAWYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFKSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIK   |
| <b>10236 gL5<br/>VL нукл.</b>              | 12 | gcctacgacatgactcagtcaccatcctccctgtccgcatccgtgggggatagagtcaccatcac<br>ctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggatcagcagaagccgggaaaggct<br>cccagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgctcggagtgccatagccgcttaagggtcc<br>ggatctggcaccgactcactctcaccattcgagcctcaaccggaggacttcgccactactact<br>gccagcagggttacaccaactccaacatcatcaaaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaat<br>caagcgtacg  |
| <b>10236 gL5<br/>Легкая цепь</b>           | 13 | AYDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISWLAWYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFKSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC   |
| <b>10236 gL5<br/>Легкая цепь<br/>нукл.</b> | 14 | gcctacgacatgactcagtcaccatcctccctgtccgcatccgtgggggatagagtcaccatcac<br>ctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggatcagcagaagccgggaaaggct<br>cccagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgctcggagtgccatagccgcttaagggtcc<br>ggatctggcaccgactcactctcaccattcgagcctcaaccggaggacttcgccactactact<br>gccagcagggttacaccaactccaacatcatcaaaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaat<br>caagcgtacgcgtacggtggccgctccctcctgttcatcttccaccctccgacgagcagctga<br>agtccggcaccgctcctcgtgtgctgctgaacaacttaccctccgagggccaaggtgca<br>gtggaaggtggacaacgcctgcagtcggcaactcccaggaatccgtaccgagcaggactc<br>caaggacagcaactactcctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcac<br>aagggtgacgctcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtccttaacc<br>ggggcgagtg |
| <b>10236 gL6<br/>VL</b>                    | 15 | AYDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISWLAWYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY  |

|  |    |   |
|--|----|---|
|  |    | YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIK  |
| <b>10236 gL6<br/>VL нукл.</b>              | 16 | gctacgacatgactcagtcceccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcaccatcac<br>ctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggtatcagcagaagccgggaaaggct<br>cccaagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgctgggagtgccctagccgctttccggtcc<br>ggatctggcaccgactcactctcaccatttcgagcctcaaccggaggacttcgccacttactact<br>gccagcaggggttacaccaactccaacatcatcaaaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaat<br>caag   |
| <b>10236 gL6<br/>Легкая цепь</b>           | 17 | AYDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISWLA WYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC  |
| <b>10236 gL6<br/>Легкая цепь<br/>нукл.</b> | 18 | gctacgacatgactcagtcceccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcaccatcac<br>ctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggtatcagcagaagccgggaaaggct<br>cccaagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgctgggagtgccctagccgctttccggtcc<br>ggatctggcaccgactcactctcaccatttcgagcctcaaccggaggacttcgccacttactact<br>gccagcaggggttacaccaactccaacatcatcaaaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaat<br>caagegtacggtggcgcctccctcctgttcatcttcccaccctccgacgagcagctgaagtccg<br>gcaccgcctcctcgtgtgctgctgaacaactctacccccgcgaggccaagggtgcagtggaa<br>ggtggacaacgcctgcagtcggcaactcccaggaatcctcaccgagcaggactccaagg<br>acagcactactcctgtctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggt<br>gtacgcctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccgggg<br>cgagtgc   |
| <b>10236 gL7<br/>VL</b>                    | 19 | AIDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISWLA WYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIK  |
| <b>10236 gL7<br/>VL нукл.</b>              | 20 | gcgatcagacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgctccgtgggagatcgcgtgactatca<br>cgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctggtaccagcagaagccagggaaggc<br>tccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgcctccggcgtgccttcacggttttctggatcc<br>ggctcgggaaccgacttaccctcaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgcaacctacta<br>ctgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcgggtggcggaaactaaggtcgaa<br>atcaag   |
| <b>10236 gL7<br/>Легкая цепь</b>           | 21 | AIDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISWLA WYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC  |
| <b>10236 gL7<br/>Легкая цепь<br/>нукл.</b> | 22 | gcgatcagacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgctccgtgggagatcgcgtgactatca<br>cgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctggtaccagcagaagccagggaaggc<br>tccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgcctccggcgtgccttcacggttttctggatcc<br>ggctcgggaaccgacttaccctcaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgcaacctacta<br>ctgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcgggtggcggaaactaaggtcgaa<br>atcaaggtggcgcctccctcctgttcatcttcccaccctccgacgagcagctgaagtccggcac<br>cgctcctcctcgtgtgctgctgaacaactctacccccgcgaggccaagggtgcagtggaaagggtg<br>gacaacgcctcgcagtcggcaactcccaggaatcctcaccgagcaggactccaaggacag<br>cacctactcctgtctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggtgtacg<br>cctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagt<br>gc |
| <b>10236 gL8<br/>VL</b>                    | 23 | AYQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISWLA WYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY  |

|   |    |   |
|---|----|---|
|   |    | YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIK  |
| <b>10236 gL8<br/>VL нукл.</b>               | 24 | gcgtatcagatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctggtaccagcagaagccagggaaggt<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgcctccggcgtgccttcacggtttctggaatccg<br>gctcgggaaccgacttcaccctaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaaactaaggtcgaat<br>caag  |
| <b>10236 gL8<br/>Легкая цепь</b>            | 25 | AYQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISWLAWYQQKPGK<br>APKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDYSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC  |
| <b>10236 gL8<br/>Легкая цепь<br/>нукл.</b>  | 26 | gcgtatcagatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctggtaccagcagaagccagggaaggt<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgcctccggcgtgccttcacggtttctggaatccg<br>gctcgggaaccgacttcaccctaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaaactaaggtcgaat<br>caaggtggccgctccctcctgtgtcacttctccaccctccgacgagcagctgaagtcggcaccg<br>cctccgtcgtgctcgtgaacaacttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaaggtgga<br>caacgccctgcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagca<br>cctactcctgtctccaccctgacctgtccaagggcggactacgagaagcacaaggtgtacgcc<br>tgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccggggcgagtgcc |
| <b>10236 gH9<br/>VH</b>                     | 27 | EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDSSKTQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLVTVSS   |
| <b>10236 gH9<br/>VH нукл.</b>               | 28 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtaagcccagcggaaacctgtccctgactt<br>gtgccgtgtcgggggtcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctcccggaaa<br>gggccttgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctgggccaagg<br>gacgcgtgaccatctcccaggactctccaagaccaaggtgcctcaagctgtccagcgtgacc<br>gctgccgacactgccgtgactattgcgcgcgggataacaacgactacgggctggacatctggg<br>gccagggtaccctcgtgactgtctcgagc  |
| <b>10236 gH9<br/>Тяжелая<br/>цепь</b>       | 29 | EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDSSKTQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN<br>TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAK<br>GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK  |
| <b>10236 gH9<br/>Тяжелая<br/>цепь нукл.</b> | 30 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtaagcccagcggaaacctgtccctgactt<br>gtgccgtgtcgggggtcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctcccggaaa<br>gggccttgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctgggccaagg<br>gacgcgtgaccatctcccaggactctccaagaccaaggtgcctcaagctgtccagcgtgacc<br>gctgccgacactgccgtgactattgcgcgcgggataacaacgactacgggctggacatctggg<br>gccagggtaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaagggccccctcctgttccctctggccc<br>cttgcctccgggtccacctccagcttaccgccctctgggctgctggtaaggaactactccccg<br>agcccgtgacagtgctctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacaccttccctgccgtg<br>ctgcagtcctccggcctgtactcctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccagcctgggcacc  |

|  |    |   |
|--|----|---|
|  |    | aagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaa<br>tctaagtacggcctccctgccccctgccctgccctgaattctgggaggaccttccgtgtcc<br>tgttcccccaaaagccaaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtgacctgctggt<br>ggtggacgtgtcccaggaagatcccagggtccagtcaattggtacgtggacggcgtggaagtg<br>cacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagtcaactccacctaccgggtggtgctccgtg<br>ctgacctgctgaccaggactggctgaacggcaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag<br>ggcctgccctccagcatgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagcccc<br>ggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccagggtgtccctgacctgtctg<br>gtcaagggttctacctctcgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagcccgagaaca<br>actacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttctctgtactctcggtgaccg<br>tggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctctgctccgtgatgcagaggccctgca<br>caaccctacaccagaagtccctgtccctgacctgggcaag  |
| <b>10236 gH10<br/>VH</b>                     | 31 | EVQLQESGPGLVKPSGTLTLCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISVDSSKTQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSS  |
| <b>10236 gH10<br/>VH нукл.</b>               | 32 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggcaagcccagcggaaacctgtccctgactt<br>gtgccgtgtcggggttcccgtgtcgaactacgcgatgtctgggtcagacagcctcccggaaa<br>gggccttgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctggccaagg<br>gacgcgtgacctatccgtggactcttccaagaccaagtgtccctcaagctgtccagcgtgacc<br>gctgccgacactgccgtgtactattgcgcggggataacaacgactacgggctggacatctggg<br>gccagggtaccctcgtgactgtctcgagc   |
| <b>10236 gH10<br/>Тяжелая<br/>цепь</b>       | 33 | EVQLQESGPGLVKPSGTLTLCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISVDSSKTQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK   |
| <b>10236 gH10<br/>Тяжелая<br/>цепь нукл.</b> | 34 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggcaagcccagcggaaacctgtccctgactt<br>gtgccgtgtcggggttcccgtgtcgaactacgcgatgtctgggtcagacagcctcccggaaa<br>gggccttgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctggccaagg<br>gacgcgtgacctatccgtggactcttccaagaccaagtgtccctcaagctgtccagcgtgacc<br>gctgccgacactgccgtgtactattgcgcggggataacaacgactacgggctggacatctggg<br>gccagggtaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaagggccccctccgtgttccctctggccc<br>cttctccccgtccacctccgagctaccgccctctgggctgectggcaaggactactccccg<br>agcccgtgacagtgtcctggaactctggcgcctgacctccggcgtgacacacttccctgccgtg<br>ctgcagctctccggcctgtactcctgtctcctcgtgaccgtgccctcctccagcctgggcacc<br>aagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaa<br>tctaagtacggcctccctgccccctgccctgccctgaattctgggaggaccttccgtgtcc<br>tgttcccccaaaagccaaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtgacctgctggt<br>ggtggacgtgtcccaggaagatcccagggtccagtcaattggtacgtggacggcgtggaagtg<br>cacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagtcaactccacctaccgggtggtgctccgtg<br>ctgacctgctgaccaggactggctgaacggcaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag<br>ggcctgccctccagcatgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagcccc<br>ggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccagggtgtccctgacctgtctg<br>gtcaagggttctacctctcgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagcccgagaaca<br>actacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttctctgtactctcggtgaccg<br>tggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctctgctccgtgatgcagaggccctgca |

|                                      |    |  |
|--------------------------------------|----|--|
|                                      |    | caaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag  |
| <b>10236 gH11 VH</b>                 | 35 | EVQLQESGPGLVKPSGTLTLTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDKSKTQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTLTVSS  |
| <b>10236 gH11 VH нукл.</b>           | 36 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagcccagcggaaacctgtccctgactt<br>gtgccgtgtcggggtccccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctccccggaaa<br>gggccttgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctgggccaagg<br>gacgcgtgaccatctcccaggacaagtccaagaccaagtgtccctcaagctgtccagcgtgac<br>cgctgccgacactgccgtgactattgcgcgcgggataacaacgactacgggctggacatctgg<br>ggccagggtaccctcgtgactgtctcgagc   |
| <b>10236 gH11 Тяжелая цепь</b>       | 37 | EVQLQESGPGLVKPSGTLTLTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDKSKTQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTLTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK  |
| <b>10236 gH11 Тяжелая цепь нукл.</b> | 38 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagcccagcggaaacctgtccctgactt<br>gtgccgtgtcggggtccccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctccccggaaa<br>gggccttgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctgggccaagg<br>gacgcgtgaccatctcccaggacaagtccaagaccaagtgtccctcaagctgtccagcgtgac<br>cgctgccgacactgccgtgactattgcgcgcgggataacaacgactacgggctggacatctgg<br>ggccagggtaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaaggccccctcgttccctctggc<br>cccttgcctccgggtccacctccgagctaccgccctctgggctgctggtcaaggactactccc<br>cgagcccgtgacagtgcttggaaactctggcgcctgacctccggcgtgcacaccttccctgcc<br>gtgctgcagctcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgccccctccagcctgggc<br>accaagacctacacctgtaactggaccacaagccctcaacaccaagggtggacaagcgggtg<br>gaatctaagtagcggccctcctgccccctgccccctgaaattctgggaggaccttccgtg<br>ttctgttcccccaaaagcccaaggacacctgatgatctccggacccccgaagtgacctgctg<br>ggtggtggacgtgtcccaggaagatcccaggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaa<br>gtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactcaactaccgggtggtgctc<br>gtgctgacctgctgcaccaggactggctgaaaggcaagagtacaagtcaaggtgtccaac<br>aagggcctgccctccagcatcgaagaccatctcaaggccaagggccagccccgcgagcc<br>ccaggtgtacacctgccccctagccaggaagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgt<br>ctggtcaagggttctaccctccgacattgccgtggaatgggagtcacaagcccagcccgaga<br>acaactacaagaccacccccctgtgctggacagcagcggctccttctctgtactctcggtga<br>ccgtggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgtcttctctgctcctgatgcacagggcct<br>gcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag |
| <b>10236 gH12 VH</b>                 | 39 | EVQLQESGPGLVKPSGTLTLTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDSSKNQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTLTVSS  |
| <b>10236 gH12 VH нукл.</b>           | 40 | gaggtgcagcttcaggaatccggaccggcttggtcaagccgagcggaaacctgtcactgactt<br>gcgcgggtgtcgggctccccctgtccaattacgcatgtcatgggtccggcaaccacctgggaaa<br>gggttggagtggattggcgacatctaccgagcgacatcattgattacgctcctgtgggccaagg<br>gtagagtgaccatcagccaggactcctccaagaaccaagtgtcgtgaagctctcctccgtgacc<br>gcagccgataaccgtgtgactattgtcccgcgacaacaacgactacggcctggatatctgggg<br>acagggaacctcgtgactgtctcgagc  |
| <b>10236 gH12</b>                    | 41 | EVQLQESGPGLVKPSGTLTLTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG   |

|                                      |    |   |
|--------------------------------------|----|---|
| <b>Тяжелая цепь</b>                  |    | KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDSSKNQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK   |
| <b>10236 gH12 Тяжелая цепь нукл.</b> | 42 | gaggtgcagcttcaggaatccggaccggcttggcaagccgagcggaaacctgactgact<br>gcgcgggtgcgggctccccctgtccaattacgcatgcatgggtccggcaaccacctgggaaa<br>gggttgagtgattggcgacatctaccgagcgacatcattgattacgctctgtggccaagg<br>gtagagtaccatcagccaggactcctcaagaaccaagtgtcgtgaagctctcctcctgacc<br>gcagccgataccgctgtgactattgtcccgcgacaacaacgactacggcctggatctgggg<br>acagggaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggcccctcctgttccctctgccc<br>cttctccccggctccactccgagctaccgccctctgggctgcctggcaaggactactccccg<br>agcccgtgacagtgtcctggaactctggcgcctgacctccggcgtgcacacctcctgcccgt<br>ctgcagctcctccgctgactcctctgctcctcctgaccgtgacctcctcctcagcctgggcacc<br>aagacctacacctgtaacgtggaccacaagcctccaacaccaaggtggacaagcgggtgaa<br>tctaagtacggcctcctgccccctgcccctgcccctgaattctggcggaccttccctgttcc<br>tgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtgacctgctggt<br>ggtggactgtcccaggaagatcccaggtccagtcaattgtagctggacggcgtggaagtg<br>cacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagtcaactccactaccgggtggtgtccgtg<br>ctgacctgctgaccaggactggctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaag<br>ggcctgcccctccagcatgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagcccc<br>ggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtcctgacctgtctg<br>gtcaagggttctacctcctcgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagcccgagaaca<br>actacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggtccttctctgactctcggtgaccg<br>tggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgttctctctgctcctgatgacgaggccctgca<br>caaccactacaccagaagtccctgtcctgagcctgggcaag |
| <b>10236 gH14 VH</b>                 | 43 | EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQDSSKNQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSS   |
| <b>10236 gH14 VH нукл.</b>           | 44 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggcaagcccagcggaaacctgtccctgact<br>gtgcccgtgctggggtcccctgctggaactacgcgatgctctgggtcagacagcctcccggaaa<br>gggccttgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctggccaagg<br>gacgctcaccatctcccaggactctccaagaaccaagtgtcctcaagctgtccagcgtgacc<br>gctgccgacctgcccgtgactattgcgcgggataacaacgactacgggctggacatctggg<br>gccagggtacctcgtgactgtctcgagc  |
| <b>10236 gH14 Тяжелая цепь</b>       | 45 | EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPG<br>KGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQDSSKNQVSLKLSSV<br>TAADTAVYYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK   |
| <b>10236 gH14</b>                    | 46 | gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggcaagcccagcggaaacctgtccctgact  |

|  |    |  |
|--|----|--|
| <b>Тяжелая цепь нукл.</b>  |    | <p>gtgccgtgtcgggggttcccgtgtcgaactacgcgatgtctgggtcagacagcctcccggaaa<br/> gggccttgaatggatggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcacatctggccaagg<br/> gacgcttcaccatctcccaggactctccaagaaccaagtgtccctcaagctgtccagcgtgacc<br/> gctgccgacactgccgtgtactattgcgcggggataacaacgactacgggctggacatctggg<br/> gccaggggtaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaaagggcccctccgtgttccctctggccc<br/> cttgcctcccgggtccacctccgagctaccgccgtctgggctgacctggtaaggactacttccccg<br/> agcccgtgacagtgtcctggaactctggcggcctgacctccggcgtgacacacttccctgccgtg<br/> ctgcagtctccggcctgtactcctgtctcctcgtgaccgtgcccctctccagcctgggcacc<br/> aagacctacactgtaactggaccacaagcctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaa<br/> tctaagtaaggcctccctgccccctgccctgccctgaattctgggggacacttccgtgttcc<br/> tgttcccccaagcccaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtgacctgctggt<br/> ggtggacgtgtcccaggaagatcccagggtccagtcaattgtacgtggacggcgtggaagtg<br/> cacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagtcaactccacctaccgggtggtgtccgtg<br/> ctgacctgctgcaccaggactggctgaacggcaagagtagaagtgaaggtgtccaacaag<br/> ggcctgccctccagcatgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagcccca<br/> ggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccagggtgacctgtctg<br/> gtcaagggttctacctcctcgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagcccagagaaca<br/> actacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttcttctgtactctcggtgaccg<br/> tggacaagtcccgggtggcaggaaggcaactcttctctgctccgtgatgcagaggccctgca<br/> caaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag</p> |
| <b>Каркас акцептора IGKV1-6 JK4 человека</b>                           | 47 | <p>AIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIRNDLGWYQQKPGK<br/> APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br/> YCLQDYNYPPLTFGGGTKVEIK</p>  |
| <b>Каркас акцептора IGKV1-6 JK4 человека нукл.</b>                     | 48 | <p>gccatccagatgaccagctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactt<br/> gccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaagccc<br/> ctaagctctgatctatgctgcatccagtttacaagtgggggtccatcaaggttcagcggcagtg<br/> gatctggcacagatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttactgt<br/> ctacaagattacaattaccctctcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaa</p>  |
| <b>Каркас акцептора IGHV4-4 JH4 человека</b>                           | 49 | <p>QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPP<br/> GKGLEWIGEIYHSGSTNYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSS<br/> VTAADTAVYYCARYFDYWQGTLVTVSS</p>   |
| <b>Каркас акцептора IGHV4-4 JH4 человека нукл.</b>                     | 50 | <p>caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagcctcggggaccctgtccctacc<br/> tgcgctgtctctggtgctccatcagcagtagtaactggtggagtgggtccagccccagg<br/> gaaggggctggagtggattgggaaatcatatagtgaggagcaccactacaaccgctcctc<br/> aagagtcgagtcaccatcagtagacaagtccaagaaccagttctcctgaagctgagctctgt<br/> gaccgccgcggacagggcctgtattactgtgcgagatacttgaactactggggccaaggaacc<br/> ctggtcaccgtctctca</p>  |
| <b>KLK5 человека (полноразмерный с сигнальной последовательностью)</b> | 51 | <p>MATARPPWMWVLCALITALLGVTEHVLANNDVSCDHPSNT<br/> VPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSRIINGSDCDMHTQPWQA<br/> ALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSL<br/> SPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPT<br/> KDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKVLQCLN<br/> ISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRSDSCQGDSSGPV<br/> VCNGSLQGLVSWGDPYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQ<br/> ANS</p>   |
| <b>KLK5 человека</b>   | 52 | <p>VTEHVLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSS<br/> SRIINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLL</p>  |

|   |    |   |
|---|----|---|
| <b>проформа</b>                                   |    | TAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYS<br>HPGHSNDLMLIKLNRIRPTKDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSG<br>WGTTKSPQVHFPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFC<br>AGDKAGRDCSQGDSGGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARPNR<br>PGVYTNLCKFTKWIQETIQANS   |
| <b>Активный<br/>KLK5<br/>человека</b>             | 53 | IINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAA<br>HCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPG<br>HSNDLMLIKLNRIRPTKDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWG<br>TTKSPQVHFPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAG<br>DKAGRDCSQGDSGGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARPNRPG<br>VYTNLCKFTKWIQETIQANS   |
| <b>ЛЕКТИ D5<br/>человека Fc<br/>кролика</b>       | 54 | EIVKLC SQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMC<br>QAYFQAENEEKKAEARARNLEKTVAPSTCSKPTCPPPELLG<br>GPSVFIFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVVSQDDPEVQFTWYI<br>NNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKC<br>KVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVS<br>LTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSYFL<br>YSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK |
| <b>KLK7<br/>человека<br/>проформа</b>             | 55 | EEAQGDKIIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNER<br>WVLTAAHCKMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGY<br>STQTHVNDLMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCT<br>VSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVVKLISPQDCTKVYKDLENS<br>MLCAGIPDSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQ<br>PNDPGVYTVQVCKFTKWINDTMKKHR  |
| <b>Активный<br/>KLK7<br/>человека</b>             | 56 | IIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAH<br>CKMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVN<br>DLMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTT<br>TSPDVTFPSDLMCVDVVKLISPQDCTKVYKDLENSMLCAGIP<br>DSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVY<br>TVQVCKFTKWINDTMKKHR   |
| <b>KLK7<br/>яванского<br/>макака<br/>проформа</b> | 57 | GQEAQGDKIIDGAPCTRGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNE<br>RWVLTAAHCKMNDYIVHLGSDTLGDRKAQRIKASRSFRHPG<br>YSTQTHVNDLMLVKLNSPARLSSTVKKVRLPSRCEPPGTTCT<br>VSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVVKLISSQDCTKVYKDMLGN<br>SMLCAGIPNSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCG<br>QPNDPGVYTVQVCKFTKWINDTIKKHR  |
| <b>Активный<br/>KLK7<br/>яванского<br/>макака</b> | 58 | IIDGAPCTRGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAH<br>CKMNDYIVHLGSDTLGDRKAQRIKASRSFRHPGYSTQTHVN<br>DLMLVKLNSPARLSSTVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTT<br>SPDVTFPSDLMCVDVVKLISSQDCTKVYKDMLGNSMLCAGIPN<br>SKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTV<br>QVCKFTKWINDTIKKHR  |
| <b>Активный<br/>KLK5<br/>мыши</b>                 | 59 | IVNGSDCQKDAQPWQGALLLGPKNLYCGAVLISPQWLLTAA<br>HCRKPVFRIRLGHHSMSPVYESGQQMFQGIKSIPHPGYSHPGH<br>SNDLMLIKMNRKIRDHSVVKPVEIACDCATEGTRCMVSGWG<br>TTSSSHNNFVKVLQCLNITVLSEERCKNSYPGQIDKTMFCAGD<br>EEGRDSCQGDSGGPVVCNGKLGQGLVSWGDFPCAQRNRPGV<br>YTNLCEVFKWIKDTMNSN   |
| <b>Активный<br/>KLK5<br/>яванского<br/>макака</b> | 60 | IINGSDCDEHTQPWQAALLLGNQLYCGGVLVHPQWLLTAA<br>HCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGIKSIPHPGYSHPG<br>HSNDLMLIKLNRIRHSTKDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWG<br>TTRSPQVHFPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAG   |

|   |    |  |
|---|----|--|
|   |    | DEAGRDSCQGDSGGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCAKPNRPG<br>VYTNLCKFTKWIQETIQANS   |
| <b>ЛЕКТИ D8<br/>человека Fc<br/>кролика</b>         | 61 | EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCA<br>MCASVFKLEEEKNDKEEKGKVEAEKVLEKTVAPSTCSKP<br>TCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDP<br>EVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDW<br>LRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPR<br>EELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAV<br>LSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQ<br>KSISRSPGK  |
| <b>CDR-L1<br/>Q24R</b>                              | 62 | RASQSISSWLA  |
| <b>CDR-L1<br/>Q24K</b>                              | 63 | KASQSISSWLA  |
| <b>10236 gL6<br/>VL нукл.<br/>Q24R</b>              | 64 | gcgatgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtcgggcctcacaatccattagctcctggtggcctggtaccagcagaagccagggaaggtc<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggtttctggtaccg<br>gctcgggaaccgactcaccctaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcggtggcggactaaggtcgaat<br>caag  |
| <b>10236 gL6<br/>Легкая цепь<br/>нукл.<br/>Q24R</b> | 65 | gcgatgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtcgggcctcacaatccattagctcctggtggcctggtaccagcagaagccagggaaggtc<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggtttctggtaccg<br>gctcgggaaccgactcaccctaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcggtggcggactaaggtcgaat<br>caaggtggcctcctcctcctggttcatttcccaccctccgacgagcagctgaagtcggcaccg<br>cctcctcgtgtgctgctgaacaacttaccctccgaggccaaggtgcagtggaggtgga<br>caacgccctgcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagca<br>cctactcctgctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgacgcc<br>tgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccggggcagtgctc |
| <b>10236 gL6<br/>VL нукл.<br/>Q24K</b>              | 66 | gcgatgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtaaggcctcacaatccattagctcctggtggcctggtaccagcagaagccagggaaggtc<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggtttctggtaccg<br>gctcgggaaccgactcaccctaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcggtggcggactaaggtcgaat<br>caag  |
| <b>10236 gL6<br/>Легкая цепь<br/>нукл.<br/>Q24K</b> | 67 | gcgatgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtaaggcctcacaatccattagctcctggtggcctggtaccagcagaagccagggaaggtc<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggtttctggtaccg<br>gctcgggaaccgactcaccctaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcggtggcggactaaggtcgaat<br>caaggtggcctcctcctcctggttcatttcccaccctccgacgagcagctgaagtcggcaccg<br>cctcctcgtgtgctgctgaacaacttaccctccgaggccaaggtgcagtggaggtgga<br>caacgccctgcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagca<br>cctactcctgctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgacgcc<br>tgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccggggcagtgctc |
| <b>10273<br/>CDR-L1</b>                             | 68 | QSSQSVYNNNDLA  |
| <b>10273<br/>CDR-L2</b>                             | 69 | RASTLAS  |
| <b>10273<br/>CDR-L3</b>                             | 70 | LGGYDDDDVDITYT   |

|   |    |  |
|---|----|--|
| <b>10273<br/>CDR-H1</b>                                     | 71 | GFSLSYGM   |
| <b>10273<br/>CDR-H2</b>                                     | 72 | ISSSGSTYYASWAKG  |
| <b>10273<br/>CDR-H3</b>                                     | 73 | DHIYRYDDYGDYPTYGMXP  |
| <b>10273<br/>VL кролика</b>                                 | 74 | AVVLTQTPSPMSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNDLAWYQQK<br>PGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDA<br>ATYYCLGGYDDDVDYTFGGGTEVVVK  |
| <b>10273<br/>VL кролика<br/>нуклеотид</b>                   | 75 | gcagtcgtgctgactcagacaccatcacccatgtctgcagctgtgggaggcacagtcaccatca<br>gttccagtcagtcagagtggtataataataacgacttagcctggatcagcagaaccagggc<br>agcctcctaagctcctgatctacaggcatccactctggcatctggggtcccgtcgcggtcagc<br>ggcagtgatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtgcagtgtagatgctgcca<br>cttactactgtctaggcgggtatgatgatgatgttgatactatacttcggcggaggaccgaggt<br>ggtggtcaaaa   |
| <b>10273<br/>VH кролика</b>                                 | 76 | QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYGMWVRQAPGK<br>GLEWIGISSSGSTYYASWAKGRFTISKSTTVDLKIASPTTED<br>TATYFCARDHIYRYDDYGDYPTYGMMPWGPGLTVSS   |
| <b>10273<br/>VH кролика<br/>нуклеотид</b>                   | 77 | cagtcggtggaggagtcgggggctgcctggcagcctgggacaccctgacactcacctgc<br>acagtccttgattctccctcagtagctatggaatgagctgggtccgccaggtccagggaaggg<br>gctggaatgatcggaattattagtagtagtgtagcacatactacgcgagctgggcaagggc<br>gattcaccatccaagacctcaccacgggtgatctgaaaatgccagtcgacaaccgagga<br>cacggccacctattctgtgccagagatcacattataggtacgatgactatggtgattacctact<br>actacggcatggaccctggggcccaggcaccctggcaccgtctcagc  |
| <b>10273<br/>mIgG<br/>кролика<br/>Легкая цепь</b>           | 78 | AVVLTQTPSPMSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNDLAWYQQ<br>KPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGV<br>QCDDAATYYCLGGYDDDVDYTFGGGTEVV<br>VKRTDAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN<br>VKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYISMSTTLTLTKDE<br>YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK  |
| <b>10273<br/>mIgG<br/>кролика<br/>Тяжелая<br/>цепь</b>      | 79 | QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYGMWVRQAP<br>GKLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKSTTVDLKIA<br>SPTTEDTATYFCARDHIYRYDDYGDYPTYGMMPWGPGL<br>TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNMVTGLCLVKGYFPE<br>PVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSTVTPSSTW<br>PSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVS<br>SVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCCVVDISKDDPEVQFSWF<br>VDDVEVHTAQTQPREEQFNSFRSVSELPIMHQDWLNGKE<br>FKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPTPKEQM<br>AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI<br>MTDGSYFVYSKLVNQLKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTE<br>KSLSHSPGK  |
| <b>10273<br/>mIgG<br/>кролика<br/>Легкая цепь<br/>Нукл.</b> | 80 | gcagtcgtgctgactcagacaccatcacccatgtctgcagctgtgggaggcacagtcaccatca<br>gttccagtcagtcagagtggtataataataacgacttagcctggatcagcagaaccagggc<br>agcctcctaagctcctgatctacaggcatccactctggcatctggggtcccgtcgcggtcagc<br>ggcagtgatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtgcagtgtagatgctgcca<br>cttactactgtctaggcgggtatgatgatgatgttgatactatacttcggcggaggaccgaggt<br>ggtggtcaaacgtacggatgctgaccaactgtatccatctccaccatccagtgagcagttaac<br>atctggaggtgcctcagtcgtgtctctgaacaactctaccccaagacatcaatgtcaagtg<br>aagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaag<br>actgcacctacagcatgagcagcaccctcagttgaccaaggacgagatgaacgacataacag<br>ctatactgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagcttcaacaggaatga |

|  |    |  |
|--|----|--|
|  |    | gtgt   |
| <b>10273</b><br><b>mIgG</b><br><b>кролика</b><br><b>Тяжелая</b><br><b>цепь Нукл.</b> | 81 | cagtcggtggaggagtccgggggtgcctggtcacgcctgggacaccctgacactcacctgc<br>acagtctctggatttcccctcagtagctatggaatgagctgggtccgccaggctccagggaaagg<br>gctggaatggatcggaaftattagtagtagtgtagcacatactacgcgagctgggcgaaaggcc<br>gattcaccatctccaagacctgaccacgggtgactgaaaatgccagtcggacaaccgagga<br>cacggccacctatttctgtgccagagatcacattataggtacgatgactatggtgattaccctacct<br>actacggcatggaccctggggcccaggcacccctggtcaccgtctcagtgccaaaacgacac<br>ccccatctgtctatccactggccctggatctgtgccaaaactaactccatggtgacctgggat<br>gcctggtcaagggctatttccctgagccagtacagtgacctggaactctggatccctgtccagc<br>ggtgtgcacacctcccagctgtctgcagctgacctctacactctgagcagctcagtgactgtcc<br>cctccagcactggcccagcagaccgtcacctgcaacgttggccaccggccagcagcacca<br>aggtggacaagaaaattgtgccagggtggtgtaagccttgcatagtacagtcaccagaag<br>tatcatctgtcttcatcttcccccaagccaaggatgtgctaccattactctgactcctaaggct<br>acgtgtgttggttagacatcagcaaggatgatcccagggtccagttcagctggtttagatgat<br>gtggaggtgcacacagctcagacgcaacccgggaggagcagttcaacagcacttccgctca<br>gtcagtgaaactcccacatgcaccaggactggtcaatggcaaggagttcaaatgcagggtca<br>cagtcagcttccctgccccatcgaaaaaccatctcaaaaaccaaggcagaccgaaggct<br>ccacaggtgtacaccattccactcccaggagcagatggccaaggataaagtcagctgacct<br>gcatgataacagacttcttccctgaagacattactgtggagtggcagtggaatgggcagccagc<br>gagaactacaagaacactcagcccatcatggacacagatggctcttactctgtctacagcaagct<br>caatgtgcagaagagcaactgggaggcaggaatactttcacctgctctgtgtacatgagggcc<br>tgcaaacaccatactgagaagagccttcccactctctgtgtaa |
| <b>10236</b><br><b>mIgG</b><br><b>кролика</b><br><b>Легкая цепь</b>                  | 82 | AYDMTQTPAS VEVAVGGTVT IKCQASQIS SWLAWYQQKP<br>GQPPKLLIYL ASTLASGVSS RFKGSGSGTQ FTLTISGVEC<br>ADAATYYCQQ GYTNSNIINT FGGGTEVVVK RTDAAPT VSI<br>FPPSSEQLTS GGASVVCFLN NFYPKDINVK WKIDGSRQN<br>GVLNSWTDQD SKDCTYSMSS TLTLTKDEYE RHNSYTCEAT<br>HKTSTSPIVK SFNRNEC   |
| <b>10236</b><br><b>mIgG</b><br><b>кролика</b><br><b>Тяжелая</b><br><b>цепь</b>       | 83 | QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFPLSN YAMSWVRQAP<br>GKGLEWIGDI YPSDIIDYAS WAKGRFTISQ TSTTVELKIT<br>GPTTEDTATY FCARDNNDYG LDIWGPGLTV TVSSAKTTPP<br>SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVKGYFPEP VVTWNSGSL<br>SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP SETVTCNVAH<br>PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD<br>VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT<br>QPREEQFNST FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAF<br>APIEKTISK TGRPKAPQVY TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI<br>TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD TDGSYFVYSK<br>LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHEK SLSHSPGK  |
| <b>10236</b><br><b>mIgG</b><br><b>кролика</b><br><b>Легкая цепь</b><br><b>Нукл.</b>  | 84 | gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtgggaggcagtcaccatcaa<br>gtgccaggccagtcagagcattagcagttggttagcctggtatcagcagaaaccaggtcagcctc<br>ccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctgggtctcatcgcggttcaaggcagtg<br>gatctgggacacagttcactctccatcagcggcgtggagtgtgccgatgctgccacttactact<br>gtcaacaggggtataactaatagtaataattattaatactttcggcggaggaccgaggtggtggtcaa<br>acgtacggatgctgcaccaactgtatccatcttcccacatccagtgagcagttaacatctggagg<br>tgccctcagctgtgtcttctgaacaacttaccaccaagacatcaatgcaagtgggaagattgat<br>ggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaaactgcacct<br>acagcatgagcagccctcacgttgaccaaggacgagatgaacgacataacagctatacctg<br>tgaggccactcacaagacatcaacttaccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg  |
| <b>10236</b><br><b>mIgG</b><br><b>кролика</b>  | 85 | cagtcggtggaggagtccgggggtgcctggtcacgcctgggacaccctgacactcacctgc<br>accgtctctgggtccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgccaggctccagggaaagg<br>gctggaatggatcggagacattatcttagtatacatagactacgcgagctgggcgaaaggcc  |

|                                     |    |   |
|-------------------------------------|----|---|
| <b>Тяжелая цепь Нукл.</b>           |    | gattcaccatctccaaacctcaccacgggtggagctgaaaatcacgggtccgacaaccgagga<br>cacggccacctatftctgtgccagagacaacaatgactatggctcggacatctggggcccaggca<br>ccctggtcaccgtctcgagtccaaaacgacacccccatctgtctatccactggccccctggatctg<br>ctgccccaaactaactccatggtgaccctgggatgacctggcaagggctatttccctgagccagtga<br>cagtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacacctcccagctgtcctgcagtctg<br>acctctacactctgagcagctcagtgactgtccccccagcaccctggcccagcgagaccgtcacc<br>tgcaacgttgcccaccggccagcagcaccaggtggacaagaaaattgtgccagggtgtgt<br>ggttgtaagcctgcatatgtacagtcccagaagtatcatctgtcttcatcttcccccaagccaa<br>ggatgtgctcaccattactctgactcctaaggcagctgtgttggtgtagacatcagcaaggatgat<br>cccgaggtccagttcagctggttgtagatgatgtggaggtgcacacagctcagcagcaacccc<br>gggaggagcagttcaacagcactttccgctcagtcagtgaaactcccacatgcaccaggactgg<br>ctcaatggcaaggagttcaaatgcagggtcaacagtgacgtttccctgccccatcgagaaaac<br>catctccaaaaccaaaggcagaccgaaggtccacaggtgtacacattccacctcccaaggag<br>cagatggccaaggataaagtcagctcagctgcataacagacttctccctgaagacattact<br>gtggagtggcagtggaatgggcagccagcggagaactacaagaactcagccccatcatgga<br>cacagatggctcttactctgtctacagcaagctcaatgtcagaagagcaactgggaggcagga<br>aatacttccactgctctgtttacatgagggcctgcacaaccaccatactgagaagagcctctccc<br>actctcctgtaaatgatcccagtgctctggagccctctgtctctacaggactctgacacctact<br>ccacccctccctgtataaa |
| <b>10236 Легкая цепь Fab</b>        | 86 | AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSWLAWYQQKPG<br>QPPKLLIYLASTLASGVSSRFKGSSTQFTLTISGVECADA<br>TYYCQQGYTNSNIINTFGGGTEVVVKRTPVAPTFLIFPPAADQ<br>VATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQN<br>SADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNR<br>GDC   |
| <b>10236 Легкая цепь Fab Нукл.</b>  | 87 | gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtgggaggcacagtcaccatcaa<br>gtgccaggccagtcagagcattagcagttggttagcctggatcagcagaaaccaggtcagcctc<br>ccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctgggtctcatcgcgggtcaaaaggcagtg<br>gatctgggacacagttcactctccatcagcggcgtggagtgtccgatgctgccacttactact<br>gtcaacagggttataactaataagtaataattataactttcggcggaggaccaggtgggtgcaaa<br>acgtacgccagttgcactactgtcctcatcttcccaccagctgctgatcaggtggcaactggaac<br>agtcaccatcgtgtgtgtggcgaataaatacttcccgatgcaccgtcactgggaggtggatgg<br>caccaccaaaacaactggcatcgagaacagtaaaacaccgcagaattctgcagattgtacctaca<br>acctcagcagcactctgacactgaccagcacacagtacaacagccacaagagtacacctgcaa<br>gggtgaccaggggcacgacctcagtcgtccagagcttcaataggggtgactgt   |
| <b>10236 тяжелая цепь Fab</b>       | 88 | QSVEESGGRLVTPGTPPLTLTCTVSGFPLSNYAMSWVRQAPGK<br>GLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKITGPTTED<br>TATYFCARDNNDYGLDIWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPC<br>CGDTPSSVTGLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFSPV<br>RQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNV AHPATNTKVDKTVAPS<br>TCSKP   |
| <b>10236 тяжелая цепь Fab Нукл.</b> | 89 | cagtcgggtgaggagtcgggggtgcctggtcacgectgggacacccctgacactcactgc<br>accgtctctgggtccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgccaggtccagggaagg<br>gctggaatggatcggagacattatcctagtatcatagactacgcgagctgggcgaaaggcc<br>gattcaccatctccaaacctcaccacgggtggagctgaaaatcacgggtccgacaaccgagga<br>cacggccacctatftctgtgccagagacaacaatgactatggctcggacatctggggcccaggca<br>ccctggtcaccgtctcgagtgggcaacctaaaggtccatcagcttcccactggccccctgctgc<br>ggggacacaccagctccacggtgacctgggctgctgtgcaaaaggctacctcccggagcca<br>gtgacctgacctggaactgggcaacctcaccatgggtgacgaccttcccgtccggc<br>agtccctcaggcctctactcgtgagcagcgtggtgagcgtgacctcaagcagccagcccgtcac<br>ctgcaacgtggcccaccagccaccaacaccaaagtggacaagaccgttgcacctcagatg<br>cagcaagccc  |

|  |    |   |
|--|----|---|
| <b>10273</b><br><b>Легкая цепь</b><br><b>Fab</b>   | 90 | AVVLTQTPSPMSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNDLAWYQQK<br>PGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDA<br>ATYYCLGGYDDDVDTYTFGGGTEVVVKRTPVAPTFLIFPPA<br>ADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSK<br>TPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQ<br>SFNRGDC  |
| <b>10273</b><br><b>Легкая цепь</b><br><b>Fab Нукл.</b>   | 91 | gcagtcgtgctgactcagacacccatcacccatgtctgcagctgtgggaggcacagtcacccatca<br>gttccagtcagtcagagtggtataataataaacgacttagcctggtatcagcagaaaccagggc<br>agcctcctaagctcctgatctacagggcatccactctggcatctggggctccgctcgggtcage<br>ggcagtgatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtgcagtgtagcagtgctcca<br>cttactactgtctagcgggtatgatgatgatgtgatactatacttccggcggaggaccaggt<br>ggtggtcaaacgtacgccagttgcactactgtcctcacttcccaccagctgctgacaggtggc<br>aactggaacagtcacccatcgtgtgtgtggcgaataaatacttcccgatgaccgtcacctggga<br>ggtggatggcaccaccaaacactggcatcgagaacagtaaacaccgcagaattctgcagat<br>tgtacctacaacctcagcagcactctgacactgaccagcacacagtacaacagccacaaagagt<br>acacctgcaaggtagccaggcagcagcctcagtcgtccagagcttcaataggggtgactgt                                     |
| <b>10273</b><br><b>тяжелая</b><br><b>цепь Fab</b>  | 92 | QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYGMSWVRQAPGK<br>GLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKSTTVDLKIASPTTED<br>TATYFCARDHIYR YDDYGDYPTY YGMDPWGPGTLVTVSSGQ<br>PKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSG<br>TLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPAT<br>NTKVDKTVAPSTCSKP   |
| <b>10273</b><br><b>тяжелая</b><br><b>цепь Fab</b><br><b>Нукл.</b>                                | 93 | cagtcggtggaggagtcgggggtgcctggtcacgcctgggacaccctgacactcacctgc<br>acagtctctggattcctcctcagtagctatggaatgagctgggtccgccaggtccagggaaagg<br>gctggaatggatcggaattattagtagtagtgtagcacatactacgcagctgggcgaaaggcc<br>gattcaccatctccaagacctgaccacgggtgatctgaaaatgccagtcggacaaccgagga<br>cacggccacctattctgtgccagagatcacattataggtacgatgactatggtgattacctact<br>actacggcatggaccctggggcccaggcaccctggtcaccgtctcagtgggcaacctaaagg<br>ctccatcagcttcccactggccccctgctcggggacacaccagctccacggtagccctggg<br>ctgcctggtcaaaggctacctcccggagccagtgaccgtgacctggaactcgggaccctcacc<br>aatggggtacgcacctcccgtccgtccggcagtcctcaggcctctactcgtgagcagcgtggt<br>gagcgtgacctcaagcagccagccctcactgcaacgtggcccaccagccaccaaacacca<br>aagtggacaagaccgttgcgccctcgacatgcagcaagccc |
| <b>ЛЕКТИ D5</b><br><b>человека</b><br><b>Fab H цепь</b>  | 94 | EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPG<br>KGLEWIGIHWASGTTFYATWAKGRFTISRDNSSGGGSGGGGS<br>REIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRPGDKMHGNLCSM<br>CQAYFQAENEKKAEARARSGGGGGGGGSKNTVYLMNS<br>LRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSASTK<br>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL<br>TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKEPKSCHHHHHHHHHHH   |
| <b>ЛЕКТИ D5</b><br><b>человека</b><br><b>Fab L цепь</b>  | 95 | DIQMTQSPSSVSAVSGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPG<br>KAPKLLIYEASKLTSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT<br>YYCGGGYSSISDTTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC  |
| <b>кролик/чело</b><br><b>века</b><br><b>химерная</b><br><b>легкая цепь</b><br><b>(hCK S171C)</b> | 96 | AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSWLAWYQQKPG<br>QPPKLLIYLASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVECADAA<br>TYYCQQGYTNSNIINTFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ<br>LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDCTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  |

|  |     |  |
|--|-----|--|
| <b>10236</b>   |     | SFNRGEC  |
| <b>кролик/чело<br/>века<br/>химерная<br/>тяжелая<br/>цепь10236</b> | 97  | QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSNYAMSWVRQAPGK<br>GLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKITGPTTED<br>TATYFCARDNNDYGLDIWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPC<br>SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRV<br>ESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV<br>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| <b>ЛЕКТИ-D5-<br/>Fc TEV</b>  | 98  | EIVKLC SQYQNQA KNGILFCTRENDPIR GPDGKM HG NLC SMC<br>QA YFQAENEEKKKA EARARNLEENLYFQGV DKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD<br>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV<br>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| <b>ЛЕКТИ-D8-<br/>Fc TEV</b>  | 99  | EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKM HG NKA<br>MCASVFKLEEEEEKNDKEEKGKVEAEKVLEENLYFQGV DKK<br>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA<br>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| <b>10236 gL5<br/>Легкая цепь<br/>нукл. минус<br/>RS</b>            | 100 | gcgtatgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtcaggcctcacaatcattagctcctggtggcctggtaccagcagaagccagggaaggct<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccacctgctccggcgtgccttcacggtttaaggatcc<br>ggctcgggaaccgacttcacctcaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgcaacctacta<br>ctgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcggtggcggaaactaaggctgaa<br>atcaagcgtacgggtgccgctcctcctggttcatcttcccacctccgacgagcagctgaagtc<br>cggcaccgctcctcgtcgtgctgctgaacaacttctacccccgcgaggccaagggtcagtgga<br>aagggtggacaacgccctgcagtcggcaactcccaggaatccgacaccgagcaggactccaag<br>gacagcactactcctgtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaagg<br>tgtacgctgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccgggg<br>cgagtgc  |
| <b>10236 gL7<br/>Легкая цепь<br/>нукл.плюс<br/>RS</b>              | 101 | gcgatcgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatca<br>cgtgtcaggcctcacaatcattagctcctggtggcctggtaccagcagaagccagggaaggc<br>tccgaagctgctgatctacctggcctccacctgctccggcgtgccttcacggttttctggatcc<br>ggctcgggaaccgacttcacctcaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgcaacctacta<br>ctgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcggtggcggaaactaaggctgaa<br>atcaagcgtacgggtgccgctcctcctggttcatcttcccacctccgacgagcagctgaagtc<br>cggcaccgctcctcgtcgtgctgctgaacaacttctacccccgcgaggccaagggtcagtgga<br>aagggtggacaacgccctgcagtcggcaactcccaggaatccgacaccgagcaggactccaag<br>gacagcactactcctgtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaagg<br>tgtacgctgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccgggg<br>cgagtgc |
| <b>10236 gL8<br/>Легкая цепь</b>                                   | 102 | gcgtatcagatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtcaggcctcacaatcattagctcctggtggcctggtaccagcagaagccagggaaggct  |

|   |     |   |
|---|-----|---|
| <b>нукл. плюс RS</b>  |     | ccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggttttctggatccg<br>gctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaaactaaggtcgaat<br>caagegtacgggtggccgctccctccgtgttcattctcccaccctccgacgagcagctgaagtccg<br>gcaccgctccgctcgtgtgctgctgaacaactctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaa<br>gggtggacaacgcctgcagtccggcaactcccaggaatccgtaccgagcaggactccaagg<br>acagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggt<br>gtacgcctgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccgggg<br>cgagtgc  |
| <b>10236 gL6<br/>Легкая цепь<br/>нукл.<br/>Q24R плюс<br/>RS</b> | 103 | gcgtatgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtcctgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtcgggctcacaatccattagctcctggctggcctgtaccagcagaagccagggaaggct<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggttttctggatccg<br>gctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaaactaaggtcgaat<br>caagegtacgggtggccgctccctccgtgttcattctcccaccctccgacgagcagctgaagtccg<br>gcaccgctccgctcgtgtgctgctgaacaactctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaa<br>gggtggacaacgcctgcagtccggcaactcccaggaatccgtaccgagcaggactccaagg<br>acagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggt<br>gtacgcctgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccgggg<br>cgagtgc  |
| <b>10236 gL6<br/>Легкая цепь<br/>нукл.<br/>Q24K плюс<br/>RS</b> | 104 | gcgtatgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtcctgggagatcgcgtgactatcac<br>gtgtaaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtaccagcagaagccagggaaggct<br>ccgaagctgctgatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggttttctggatccg<br>gctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacctactact<br>gccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaaactaaggtcgaat<br>caagegtacgggtggccgctccctccgtgttcattctcccaccctccgacgagcagctgaagtccg<br>gcaccgctccgctcgtgtgctgctgaacaactctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaa<br>gggtggacaacgcctgcagtccggcaactcccaggaatccgtaccgagcaggactccaagg<br>acagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggt<br>gtacgcctgcgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccgggg<br>cgagtgc |

Изобретение далее будет описано посредством примеров со ссылками на варианты осуществления, проиллюстрированные на прилагаемых чертежах.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1: Клонирование, экспрессия и очистка белков калликреина и доменов ЛЕКТИ

Оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок в соответствии с SEQ ID NO: 51, клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих собственной разработки с использованием сайтов HindIII/EcoRI, с получением вектора, кодирующего белок KLK5 человека без меток.

Последовательности KLK5 мыши и яванского макака (супо) клонировали аналогичным образом, чтобы сделать возможным получение активных форм белков, содержащих SEQ ID NO: 59 и 60, соответственно.

Домен 5 (D5) и домен 8 (D8) ЛЕКТИ человека (Uniprot Q9NQ38), содержащие остатки 292-353 и 490-558 соответственно (согласно нумерации в Uniprot), клонировали и экспрессировали для использования в качестве эталонных белков в анализах *in vitro*.

Нуклеотидные последовательности домена 5 и домена 8 ЛЕКТИ человека,

оптимизированные для экспрессии в клетках млекопитающих, отдельно клонировали в собственный экспрессирующий вектор млекопитающих, кодирующий Fc-фрагмент кролика, с использованием сайтов HindIII/XhoI, с получением векторов, кодирующих либо последовательность домена 5 LEKTI с C-концевым Fc-фрагментом кролика (SEQ ID NO: 54) или последовательность домена 8 LEKTI с C-концевым Fc-фрагментом кролика (SEQ ID NO: 61). Кодированные белки будут обозначаться как LEKTI D5 Fc кролика и LEKTI D8 Fc кролика, соответственно.

Слитые Fc-белки кролика KLK5, LEKTI домен 5 и LEKTI домен 8 экспрессировали путем транзиторной трансфекции с использованием системы экспрессии Expi293™ (Life Technologies™) в соответствии с протоколом производителя. Во время экспрессии KLK5 автоматически активируется с образованием активного KLK5 (содержащего SEQ ID NO: 53 или остатки I67-S293 SEQ ID NO: 51) в супернатанте. Клетки собирали через 5 дней после трансфекции и супернатанты сразу же использовали для очистки. Супернатанты, содержащие активный KLK5 человека (или мыши, или яванского макака), разбавляли в 4 раза буфером А (50 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl) и загружали в катионообменную колонку HiTrap SP HP. Связанные белки элюировали солевым градиентом, созданным в общей сложности на 10 объемах колонки, с использованием буфера А (50 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl) и буфера В (50 mM Tris, pH 7, 1 M NaCl). Фракции, содержащие очищенный активный KLK5 человека (мыши или яванского макака) объединяли, концентрировали и дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке S200 26/60, уравновешенной буфером, состоящим из 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5% глицерина при pH 7,2. Анализ SDS-PAGE показал, что белки подвергались гликозилированию во время экспрессии. Анализ с помощью масс-спектрометрии дал ожидаемую молекулярную массу. Супернатанты, содержащие слитый белок LEKTI D5 человека Fc кролика (согласно SEQ ID NO: 54), сначала подвергали аффинной хроматографии с Протеином А. Супернатанты загружали в колонки HiTrap™ Протеин А объемом 5 мл. Связанные белки элюировали 1M буфером лимонной кислоты, pH 2, и фракции нейтрализовали 2M Tris-HCl, pH 8,5. Фракции, содержащие слитый белок LEKTI D5 Fc кролика, объединяли, концентрировали и далее очищали эксклюзионной хроматографией с использованием колонки S200 26/60, уравновешенной PBS. Фракции, содержащие очищенный слитый белок LEKTI D5 человека Fc кролика, затем объединяли и концентрировали. Слитый белок LEKTI D8 Fc кролика (согласно SEQ ID NO: 61) очищали аналогичным образом из супернатантов трансфицированных клеточных культур.

Слитую молекулу LEKTI D5 Fab (согласно SEQ ID NO: 94 и 95) экспрессировали и очищали с помощью катионообменной хроматографии. Нуклеотидную последовательность домена 5 LEKTI, фланкированную на 5'- и 3'-концах последовательностями, кодирующими линкеры Gly4Ser, интегрировали в каркас 3 последовательности тяжелой цепи Fab, специфичного к альбумину (как описано в WO2020011868, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки); метку, кодирующую 10xHis, также помещали на 3'-конце N-цепи Fab. Последовательность

тяжелой цепи слияния LEKTI D5 Fab оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих, клонировали в экспрессирующий вектор собственной разработки и совместно трансфецировали соответствующей легкой цепью, также оптимизированной для экспрессии у млекопитающих, в клетках CHO SXE. Трансфецированные клетки культивировали в вентилируемых колбах при 32°C в течение 13 дней. Собирали супернатант, концентрировали и заменяли буфер на 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7 перед загрузкой на колонку SP Sepharose HP. Связанные белки элюировали с градиентом соли, полученном в общей сложности на 10 объемах колонки с использованием буфера А (50 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl) и буфера В (50 mM Tris, pH 7, 1 M NaCl). Фракции, содержащие слитый белок LEKTI D5 Fab, объединяли и далее очищали с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием колонки S200, уравновешенной PBS, pH 7,4. Соответствующие фракции объединяли.

Нуклеотидные последовательности человека и яванского макака, кодирующие полноразмерные белки KLK7, экспрессировали аналогично KLK5 человека, генерирующему про-KLK7 (включая SEQ ID NO: 55 и 57, соответственно). В отличие от KLK5, KLK7 не активируется автоматически во время экспрессии, поэтому активные формы KLK7 человека и яванского макака (содержащие SEQ ID NO: 56, 58, соответственно) были созданы с использованием термолизина для отщепления последовательности пропептида от соответствующих очищенных белков. Белки про-KLK7 человека и яванского макака (содержащие SEQ ID NO: 55 и 57) разбавляли до 1 мг/мл активационным буфером (50 mM Tris, pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0,05% Brij 35). Термолизин от Sigma<sup>TM</sup> (25 мг) ресуспендировали в 25 мл буфера для расщепления (50 mM Tris, pH 8, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>), добавляли в соотношении 1:10 к белкам про-KLK7 на 45 минут при 37°C перед смешиванием с анионообменной смолой DEAE (GE Life Sciences<sup>TM</sup>) для связывания и удаления термолизина. Элюат собирали в виде активного KLK7 (человеческого или яванского макака), буфер заменяли на 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% глицерина, 1 mM EDTA и концентрировали примерно до 3,2 мг/мл. Аналогичным образом получали и расщепляли про-KLK7 мыши с получением активного фермента.

KLK2 человека был получен от R&D Systems<sup>TM</sup> (кат. № 4104-SE-010) в качестве активного белка.

KLK4 человека был получен от R&D Systems<sup>TM</sup> (каталожный номер 1719-SE) в виде проформы и активирован следующим образом. Pro-KLK4 человека разбавляли до 200 мкг/мл в 50 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,5. Бактериальный термолизин был получен от R&D Systems<sup>TM</sup> (кат. № 3097-ZN) и разбавлен тем же буфером до концентрации 2 мкг/мл. Равные объемы про-KLK4 человека и термолизина объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для активации. Реакцию останавливали EDTA до конечной концентрации 10 mM.

Пример 2: Получение антител путем иммунизации KLK5

Самкам новозеландских белых кроликов (>2 кг) проводили подкожную

иммунизацию 100 мкг 0,4 мг/мл активного KLK5 человека и активного KLK7 человека (экспрессированного в соответствии с примером 1), смешанного с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (Sigma<sup>TM</sup>). Животным с интервалом в 21 день вводили повторные инъекции, содержащие 100 мкг того же иммуногена, смешанного с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда (Sigma<sup>TM</sup>). Прекращение произошло через 14 дней после последней бустерной иммунизации, когда были приготовлены суспензии одиночных клеток селезенки, костного мозга и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и заморожены в 10% диметилсульфоксиде (DMSO) в фетальной телячьей сыворотке (FCS) при -80°C.

Культуры В-клеток получали с использованием метода, аналогичного описанному Tickle et al., 2015 J Biomol Screen: 20(4), 492-497. Вкратце, клетки лимфатических узлов, спленоциты или мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) иммунизированных животных культивировали при плотности 2000 клеток на лунку в 96-луночных культуральных планшетах со штрих-кодом в среде RPMI 1640 (Gibco<sup>TM</sup>) с добавлением 200 мкл/лунку 10% FCS (Sigma Aldrich<sup>TM</sup>), 2% раствор HEPES (Sigma Aldrich<sup>TM</sup>), 2% раствор L-глутамин (Gibco<sup>TM</sup>), 1% раствор пенициллина/стрептомицина (Gibco<sup>TM</sup>), 0,2% нормоцин (Invivogen<sup>TM</sup>), 0,1% β-меркаптоэтанол (Gibco<sup>TM</sup>), а также с использованием фидерных клеток, экспрессирующих CD40L и IL-2, в присутствии или в отсутствие супернатанта, стимулирующего В-клетки (BSS). BSS получают путем культивирования PBMC в присутствии митогенных агентов форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA) и фитогемагглютинаина-L (PHA-L) в течение 6 дней перед сбором супернатанта. Планшеты инкубировали шесть дней при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Культуры были созданы с использованием В-клеток от всех иммунизированных животных, и в общей сложности было проскринировано примерно  $1 \times 10^9$  В-клеток.

Через шесть дней супернатанты подвергали скринингу на связывание с человеческим KLK5 (полученным, как в примере 1) с помощью мультиплексного гомогенного анализа связывания на основе флуоресценции с использованием гранул стрептавидина Sol-R2 (TTP Labtech<sup>TM</sup>), покрытых биотинилированным человеческим KLK5 в качестве источника целевого антигена и гранул стрептавидина Sol-R4 (TTP Labtech<sup>TM</sup>), покрытых родственным KLK7 для встречного скрининга. Lightning-Link Rapid Биотин типа В (Expedeon<sup>TM</sup>) использовали для биотинилирования белков с использованием 5-кратного молярного избытка белка по сравнению с протоколом поставщика, чтобы избежать полной модификации всех остатков лизина. В общей сложности 10 мкл супернатанта из 96-луночных культуральных планшетов со штрих-кодом переносили с помощью устройства обработки жидкости Agilent Bravo в 384-луночные планшеты со штрих-кодом и черными стенками для анализа, содержащие гранулы Sol-R, покрытые биотинилированным KLK, как указано выше, и FITC-конъюгированные козы антитела против Fc кролика (Jackson ImmunoResearch<sup>TM</sup>). Через 1 час инкубации планшеты считывали на приборе с зеркальным шаром (TTP-Labtech<sup>TM</sup>).

После первичного скрининга супернатанты, положительные в отношении

связывания с KLK5, объединяли в 96-луночных мастер-планшетах со штрих-кодом с использованием робота для подбора совпадений Beckman Coulter BiomekNXP™, а В-клетки в планшетах для клеточных культур замораживали при -80°C. Во-первых, объединенные супернатанты подвергали повторному скринингу для подтверждения связывания с человеческим KLK5 с помощью технологии флуорометрического микрообъемного анализа (FMAT). На короткое время 10 мкл супернатанта переносили на черные планшеты Greiner со штрих-кодом. 50 мкл/планшет 10 мкм суперавидина (Bangs Beads™) покрывали биотинилированным KLK5 человека, смешанным с Alexa-647™-меченым козьим антителом против кроличьего Fc-фрагмента IgG (Jackson ImmunoResearch™). Затем добавляли супернатант и планшеты считывали с помощью Applied Biosystems™ Cellular Detection System 8200.

Ряд антител выбирали для связывания с KLK5 и впоследствии исследовали на их способность специфически ингибировать KLK5 и их специфичность в отношении KLK5 по сравнению с другими калликреинами.

### Пример 3: Идентификация ингибирующих KLK5 антител

Для идентификации антител, способных специфически ингибировать активность KLK5, среди протеаз и ингибиторов протеаз, присутствующих в комплексном супернатанте В-клеток, был разработан анализ скрининга. На черные 384-луночные планшеты Nunc Maxisorp (Sigma Aldrich™) наносили покрытие в виде F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента козьего антитела против Fc-фрагмента IgG (Jackson ImmunoResearch™) в концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере и оставляли на ночь при 4°C. Планшеты промывали 3 раза на устройстве для промывки планшетов Biotek™ с помощью PBS/0,1% Tween-20 и блокировали 20 мкл/лунку PBS/1% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре. Супернатанты В-клеток добавляли в планшеты с 25 мкл 1 нМ слитого белка LEKTI D5 Fc кролика, добавленного в контрольные лунки в качестве положительного контроля для ингибирования и буфера А для анализа (50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 0,05% (об./об.) Tween-20, рН 7,6) добавляли в отдельный набор контрольных лунок в качестве отрицательного контроля ингибирования. Планшеты инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, а затем трижды промывали на устройстве для промывки планшетов Biotek™ путем добавления смеси PBS/0,1% Tween-20, 10 мкл 250 пМ KLK5 человека в аналитическом буфере А в каждую лунку, и планшеты инкубировали в течение ночи при комнатной температуре для возможности полной ассоциации. Субстрат Вос-VPR-АМС (Cambridge Research Biochemicals™) в аналитическом буфере А добавляли в лунки до конечной концентрации 600 мкМ и определяли флуоресценцию (λ<sub>ex</sub>380 нм λ<sub>em</sub>430 нм) через 4 часа с использованием планшет-ридера PHERAStar FSX (BMG Labtech™).

Данные анализировали для определения процентного ингибирования активности KLK5 с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{Ингибирования} = 100 \times (1 - (\text{Тест} - \text{Положительный}) / (\text{Отрицательный} - \text{Положительный}))$$

где Тест - это значение флуоресценции для тестируемого антитела,

Положительный - это среднее значение флуоресценции положительного контроля для лунок ингибирования, а Отрицательный - это среднее значение флуоресценции отрицательного контроля для лунок ингибирования.

Супернатанты, показавшие ингибирование >40%, считались удачными. Это составило примерно 4% всех скринированных супернатантов. Эти антитела были выбраны для восстановления вариабельной области.

Чтобы идентифицировать клетки, секретирующие специфические антитела, чтобы обеспечить восстановление генов вариабельных областей антител из гетерогенной популяции активированных В-клеток, необходимо было выполнить стадию деконволюции. Использовали метод флуоресцентных фокусов (Clargo et al., 2014). Вкратце, клетки, секретирующие антитела, инкубировали в статическом режиме при 37°C в течение 1 часа в присутствии гранул стрептавидина (New England Biolabs™), покрытых биотинилированным человеческим KLK5 и конъюгатом FITC козьего антитела против кроличьего Fc-фрагмент (Jackson ImmunoResearch™). Затем по окружающему их флуоресцентному ореолу идентифицировали клетки, секретирующие антиген-специфические антитела. Ряд этих отдельных клонов В-клеток, идентифицированных с помощью микроскопа Olympus, затем собирали с помощью микроманипулятора Eppendorf™ и помещали в пробирку для ПЦР. кДНК из отдельных клеток получали с помощью стандартной ОТ-ПЦР, а последующую ПЦР вариабельных последовательностей иммуноглобулина для тяжелых и легких цепей проводили с использованием праймеров, специфичных для генов иммуноглобулина, с последующей вложенной ПЦР, включающей перекрывающиеся векторные сайты, что позволяет проводить прямое клонирование вариабельной области в экспрессирующий вектор млекопитающих, содержащий IgG кролика (VH) или каппа-цепь кролика (VL). Конструкции тяжелой и легкой цепей совместно трансфецировали в клетки ExpiHEK-293 с использованием ExpiFectamine™ (Life Technologies™) и рекомбинантного антитела, экспрессированного в 125-миллилитровой колбе Эрленмейера™ объемом 30 мл. После 5-7 дней культивирования супернатанты собирали и антитела очищали с помощью аффинного захвата с Протеином А с использованием чистой хроматографической системы АКТА. Колонку с Протеином А HiTrap MabSelect™ SuRe™ (GE Healthcare) на 1 мл присоединяли к системе и колонку уравнивали в PBS с pH 7,4 перед нанесением на колонку супернатанта клеточной культуры при скорости потока 0,25 мл/мин. Затем колонку промывали PBS, pH 7,4, связанный материал элюировали цитратом натрия, pH 3,4, и нейтрализовали соответствующим объемом 2M Tris-HCL, pH 8,5. В элюированных фракциях заменяли буфер на PBS (Sigma), pH 7,4, и пропускали через фильтр 0,22 мкм. Окончательный очищенный материал анализировали с помощью сканирования A280, SE-UPLC (метод VEN200) и на эндотоксин с использованием системы Endosafe®PTS™.

Из этого анализа кроличьего антитела 10236 и 10273 показали сильное ингибирование и были выбраны для дальнейшей характеристики.

Пример 4: Идентификация специфических ингибирующих антител KLK5

Очищенные кроличьи антитела 10236 и 10273 затем подвергали скринингу для подтверждения их ингибирующей активности в отношении KLK5 и определения специфичности в отношении KLK5 с использованием панели других членов семейства калликреинов с последовательностями человека, включая KLK2, KLK4 и KLK7, вместе с KLK5 и KLK7 мыши и яванского макака. Для каждого антитела готовили серию точечных полулогарифмических разведений в диапазоне от 600 нМ до 20 пМ, и 5 мкл переносили в черные 384-луночные планшеты для анализа (Corning™, кат. n.3575) с использованием Beckman Coulter FXTM и системы Multidrop. 15 мкл активных рекомбинантных белков калликреина человека добавляли в соответствующие лунки для достижения следующих конечных концентраций для анализа: 60 пМ KLK5, 250 пМ KLK7, 500 пМ KLK2, 30 пМ KLK4, 30 пМ KLK5 яванского макака, 500 пМ KLK7 яванского макака, 30 пМ KLK5 мыши или 10 нМ KLK7 мыши в буфере для анализа мыши (KLK7). 50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 200 мкМ EDTA, 0,05% (об./об.) Tween-20, pH 7,6). В качестве контроля в лунки добавляли только 20 мкл аналитического буфера А (без белка KLK) для достижения 0% активности. ЛЕКТИ D5 Fc кролика использовали в качестве положительного контроля на ингибирование (тестировали в том же диапазоне концентраций, что и антитела), в то время как 15 мкл соответствующих активных белков калликреина человека добавляли к 5 мкл аналитического буфера А для 100% эталонной активности. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение ночи перед добавлением следующих пептидных субстратов с использованием многокапельного устройства: Boc-VPR-AMC (Cambridge Research Biochemicals™) для KLK5 человека (300 мкМ), KLK2 человека (30 мкМ), KLK5 мыши (300 мкМ) и KLK5 яванского макака (450 мкМ); KHLF-AMC (Cambridge Research Biochemicals™) для KLK7 человека и яванского макака (90 мкМ и 150 мкМ, соответственно), PFR-AMC (R&D Systems™) для KLK4 человека (200 мкМ) и Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH2 (R&D Systems™) для KLK7 мыши (150 мкМ). Образцы инкубировали в течение 4 часов и считывали на планшет-ридере Pherastar FSX (BMG Labtech™) при  $\lambda_{ex}$ 380 нм и  $\lambda_{em}$ 430 нм для Boc-VPR-AMC, PFR-AMC и KHLF-AMC и при  $\lambda_{ex}$ 320 нм и  $\lambda_{em}$ 400 нм для Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH2. Данные анализировали для определения процента ингибирования, как описано в Примере 3. Данные были построены в зависимости от концентрации тестируемого антитела и 4-параметрической сигмовидной кривой для определения IC50 (Genedata Screener™).

В дополнение к кроличьему антителу 10236 для этого измерения полинуклеотидные последовательности кроличьих переменных областей антител 10236 и 10273 клонировали на модифицированной версии мышиного вектора SКарра, содержащего мутацию S171C, для воссоздания дополнительной дисульфидной связи, обнаруженной в кроличьих легких цепях VK, не присутствующей в константных областях мыши (SEQ ID NO: 80 и 81 для кроличьего антитела 10273 mIgG и SEQ ID NO: 84 и 85 (или нуклеотиды 1-1314 SEQ ID NO: 85) для кроличьего антитела 10236 mIgG). В результате были получены антитела, содержащие SEQ ID NO: 82 и 83 для кроличьего антитела 10236 mIgG и SEQ ID NO: 78 и 79 для кроличьего антитела 10273 mIgG.

Кроличьи антитела 10236 и 10237 mIgG продемонстрировали сильное ингибирование KLK5 человека без активности (т. е. ниже порога 40% в соответствии с критериями отбора в примере 2) по сравнению с другими тестируемыми белками человека этого семейства (KLK2, 4 и 7 человека). Также было продемонстрировано сильное ингибирование KLK5 яванского макака, но не KLK7 яванского макака. Никакой ингибирующей активности не было обнаружено ни в отношении KLK5 мыши, ни в отношении KLK7 мыши. Результаты IC50 для кроличьего антитела 10236, 10273 и кроличьего Fc LEKTI D5 представлены в Таблице 2.

Таблица 2

|                             | Hu<br>KLK5      | Hu<br>KLK<br>2 | Hu<br>KLK<br>4 | Hu<br>KLK<br>7 | KLK5<br>яванского<br>макака | KLK7<br>яванского<br>макака | KLK<br>5<br>мыш<br>и | KLK<br>7<br>мыш<br>и |
|-----------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Обозначение антитела</b> | <b>IC50 (M)</b> |                |                |                |                             |                             |                      |                      |
| <b>10236 mIgG</b>           | 2,40E-10        | NI             | NI             | NI             | 3,30E-11                    | NI                          | NI                   | NI                   |
| <b>10236 IgG кролика</b>    | 1,74E-10        | NI             | NI             | NI             | 2,76E-11                    | NI                          | NI                   | NI                   |
| <b>10273 mIgG</b>           | 3,48E-11        | NI             | NI             | NI             | 3,01E-10                    | NI                          | NI                   | NI                   |
| <b>LEKTI D5 Fc</b>          | 1,03E-10        | n/a            | n/a            | n/a            | n/a                         | n/a                         | n/a                  | n/a                  |

NI=нет ингибирования; Hu=человек; Су=супо; Му=мышь; n/a=недоступно

Пример 5: Определение аффинности KLK5-специфических антител

Кинетику связывания мышинных молекул IgG с человеческим KLK5 оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore T200, (GE Life Sciences<sup>TM</sup>) при 25°C.

Специфическое козье антитело против мышинового Fc IgG (Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с помощью химического связывания с амином до уровня приблизительно 7000 RU. Каждый цикл анализа состоял из захвата молекул анти-KLK5 IgG на поверхности анти-Fc, введения аналита KLK5 (приготовленного на месте) в течение 300 с при скорости 30 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 600 с. В конце каждого цикла поверхность регенерировали со скоростью потока 10 мкл/мин, используя 60-секундную инъекцию 50 mM HCl, затем 30-секундную инъекцию 5 mM NaOH и последнюю 60-секундную инъекцию 50 mM HCl. KLK5 человека титровали от 20 нМ до 0,25 нМ (4×3-кратные серийные разведения) в рабочем буфере HBS-EP+ (GE Healthcare), дополненном NaCl, до конечной концентрации 300 mM. Ввод холостой пробы буфера был включен, чтобы вычистить фон и смещение показаний прибора.

Кинетические параметры определяли с использованием модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation.

Аффинности кроличьих антител 10236 и 10273 показаны в Таблице 3.

Таблица 3

| антитела кролик/мышь | ka (Mc <sup>-1</sup> ) | kd (с <sup>-1</sup> ) | KD (нМ) |
|----------------------|------------------------|-----------------------|---------|
| 10236                | 3,00E+06               | 5,17E-04              | 172,3   |
| 10273                | 1,14E+06               | 1,84E-04              | 160,0   |

Пример 6: Характеристика антитела 10236

Связывание LEKTI с KCLK5 в присутствии антитела 10236

Были проведены эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом (SPR), чтобы определить, конкурирует ли антитело 10236 с белком LEKTI D5 за связывание с KCLK5 человека. Эти анализы позволили сравнить аффинность слитого белка LEKTI D5 Fab к белку KCLK5 отдельно к KCLK5 человека в комплексе с антителом 10236.

Кинетические измерения связывания слитого белка LEKTI D5 Fab с KCLK5 человека проводили с использованием Biacore T200 (GE Life Sciences<sup>TM</sup>). Для подготовки поверхности чипы CM5 (GE Life Sciences<sup>TM</sup>) сначала активировали 5-минутной инъекцией (30 мкл мин<sup>-1</sup>) смеси EDC/NHS (GE Life Sciences<sup>TM</sup>), а затем инъекцией 100 мкг мл<sup>-1</sup> слитого белка LEKTI D5 Fab (UCB) в ацетатном буфере, pH 5 (GE Life Sciences<sup>TM</sup>) для достижения 80 RU иммобилизованного слитого белка LEKTI D5 Fab на поверхности чипа. Наконец, для дезактивации поверхности использовали инъекцию 1 М гидрохлорида этаноламина-NaOH, pH 8,5. Затем вводили увеличивающиеся концентрации KCLK5 человека от 0,32 до 32 нМ в буфере HBS-EP (GE Life Sciences<sup>TM</sup>) в режиме кинетики одиночного цикла. Значения, полученные для инъекций только буфера, вычитали из значений, полученных для инъекций KCLK5, и кинетику определяли путем аппроксимации к модели связывания 1:1 в программном обеспечении оценки Biacore (GE Life Sciences<sup>TM</sup>).

Чтобы определить, способен ли LEKTI человека связывать человеческий KCLK5, когда KCLK5 человека связан с кроличьим антителом 10236, поверхности для захвата антител готовили с использованием поликлонального козьего антитела против кроличьего Fc и Ab 10236, захваченного, как описано в Примере 4. Затем вводили 20 нМ KCLK5 человека до тех пор, пока поверхность не достигала насыщения. Затем инъецировали слитый белок LEKTI D5 Fab (полученный, как описано в примере 1) в концентрациях от 30 пМ до 100 нМ. Значения для инъекций только буфера сначала вычитали из значений, полученных с аналитами, перед аппроксимацией к кинетической модели связывания 1:1 в программном обеспечении для оценки Biacore<sup>TM</sup> (GE Life Sciences<sup>TM</sup>).

Для сравнения, слитый белок LEKTI D5 Fab иммобилизовали на поверхности чипа перед мониторингом взаимодействия с человеческим KCLK5. Слитый белок LEKTI D5 Fab человека был способен связываться с KCLK5 человека, когда KCLK5 человека уже находится в комплексе с кроличьим антителом 10236 с аффинностью 120 нМ (Таблица 4А). Хотя аффинность LEKTI человека к KCLK5 человека в отсутствие кроличьего антитела 10236 выше (40 пМ), этот анализ демонстрирует, что, связывая KCLK5 человека в присутствии или в отсутствие LEKTI человека, кроличье антитело 10236 может придавать дополнительную ингибирующую активность KCLK5 человека.

Таблица 4А

|                      | <b>ka (Mc<sup>-1</sup>)</b> | <b>kd (c<sup>-1</sup>)</b> | <b>KD (M)</b> |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------|
| Только KLK5 человека | 5,70E+05                    | 2,30E-05                   | 4,00E-11      |
| 10236+KLK5 человека  | 5,90E+04                    | 7,30E-03                   | 1,20E-07      |

#### Образование комплекса LEKTI-KLK5-антитело 10236

KLK5 продуцировался в клетках HEK293 в виде секретируемого белка с N-концевой расщепляемой TEV 8xHis-меткой. Белок сначала очищали из кондиционированных сред с помощью аффинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>. Фракции из колонки Ni<sup>2+</sup>, содержащие KLK5, объединяли и расщепляли протеазой TEV для удаления His-метки, затем проводили вторую стадию аффинности к Ni для удаления протеазы TEV, позволяя расщепленному KLK5 проходить через колонку. Фракцию, проходящую через вторую колонку Ni<sup>2+</sup>, концентрировали и пропускали через колонку эксклюзионной хроматографии в 50 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% глицерин. Фракции KLK5 из SEC объединяли, концентрировали примерно до 10 мг/мл и хранили при -80°C.

Домен 5 LEKTI (LEKTID5 Fc) в соответствии с SEQ ID NO: 98 и домен 8 LEKTI (LEKTID8 Fc) в соответствии с SEQ ID NO: 99 продуцировали в клетках HEK293 в виде секретируемых белков с C-концевой расщепляемой TEV Fc-меткой. Эти белки очищали, пропуская кондиционированную среду через гранулы с Протеином А. Связанный белок элюировали 0,1 М лимонной кислотой, pH 2, и фракции нейтрализовали добавлением 2 М Tris-HCl, pH 8,5. Фракции из колонки с Протеином А, содержащие либо домен 5 LEKTI, либо домен 8, объединяли и удаляли метку Fc с помощью протеазы TEV, получая LEKTI D5 или LEKTI D8. Расщепленный белок концентрировали до ~15 мг/мл для эксклюзионной хроматографии. SEC проводили в PBS, pH 7,2. Фракции, содержащие LEKTI, объединяли и концентрировали до ~10 мг/мл и хранили в замороженном виде при -80°C.

Кроличье Fab-антитело 10236 экспрессировали в клетках HEK293 в виде секретируемого белка. Экспрессирующие конструкции, содержащие SEQ ID NO: 87 и 89, совместно трансфецировали в молярном соотношении 1:1. Секретируемый Fab (содержащий SEQ ID NO: 86 и 88) очищали путем пропускания кондиционированной среды через гранулы с Протеином G и элюировали 0,1 М глицином, pH 2,7. Фракции нейтрализовали добавлением 2М Tris-HCl, pH 8,5. Белок подвергали диализу в PBS, pH 7,2, затем концентрировали до ~ 10 мг/мл и хранили в замороженном виде при -80°C.

Комплексы KLK5, LEKTID5 или LEKTID8 и кроличьего Fab-антитела 10236 образовывали, сначала инкубируя 25 мкМ KLK5 с 25 мкМ LEKTID5 или LEKTID8 в течение 60 минут на льду, затем добавляя 25 мкМ кроличьего Fab-антитела 10236 и продолжая инкубацию в течение еще 60 минут на льду. Смесь вводили в колонку Superdex 200® для эксклюзионной хроматографии, уравновешенную PBS, pH 7,2, которую последовательно подсоединяли к ВЭЖХ. Пиковые фракции собирали для анализа с помощью SDS-PAGE. На Фигурах 1А и 1В показаны хроматограммы SEC только KLK5 человека (сплошная линия, крайняя справа), отдельно кроличьего Fab-антитела 10236 (пунктирная линия), бинарного комплекса KLK+LEKTID5 или D8 человека (Фигура 1А

или 1В, соответственно, длинная черточка), и тройной комплекс KLK5+LEKTID5 или D8+кроличье Fab-антитело 10236 (Фиг. 3А или 3В, соответственно, короткая черта слева).

Молекулярная масса (MW) компонентов каждого пика была подтверждена SDS-PAGE, как показано на Фигуре 2.

В целом комплексы между KLK5, LEKTID5 или LEKTID8 и кроличьим Fab-антителом 10236 легко образуются при смешивании в соотношении 1:1:1 путем смешивания KLK5 человека с каждым фрагментом LEKTI по отдельности, а затем инкубации бинарных комплексов с кроличьим Fab-антителом 10236. Бинарные и тройные комплексы наблюдали при SEC и SDS-PAGE пиковых фракций, что указывает на их стабильность и пригодность для выделения/очистки от других видов.

Пример 7: Кристаллизация комплекса KLK5/Fab-антитело 10236.

KLK5 человека экспрессировали путем транзиторной трансфекции с использованием экспрессирующей системы Expi293™ (Life Technologies™) в соответствии с протоколом производителя с добавлением кифунензина (Sigma®) в конечной концентрации 5 мМ. Кифунензин является мощным ингибитором фермента маннозидазы I и в основном используется в клеточных культурах для производства гликопротеинов с высоким содержанием маннозы.

Во время экспрессии KLK5 белок самоактивируется с образованием активного белка KLK5 (остатки I67-S293 (нумерация UniProt Q9Y337) SEQ ID NO: 53) в супернатанте. Клетки собирали через 5 дней после трансфекции и супернатанты сразу же использовали для очистки. Супернатанты, содержащие активный KLK5 человека, разбавляли в 4 раза буфером А (50 мМ Tris, pH 7, 50 мМ NaCl) и загружали на катионообменную колонку HiTrap SP HP. Связанные белки элюировали в солевом градиенте, полученном в общей сложности на 10 объемах колонки с использованием буфера А (50 мМ Tris, pH 7, 50 мМ NaCl) и буфера В (50 мМ Tris, pH 7, 1 М NaCl). Фракции, содержащие очищенный активный KLK5 человека, объединяли, концентрировали и дополнительно очищали эксклюзионной хроматографией на колонке S200 26/60, которую уравнивали 20 мМ Tris, 150 мМ NaCl, при pH 7,2.

KLK5 охарактеризовывали с помощью SDS-PAGE, и он мигрировал в положение на геле, соответствующее ожидаемой молекулярной массе (MW) гликозилированного белка с высоким содержанием маннозы ~ 35-38 кДа (Фигура 3).

Затем человеческий белок KLK5 обрабатывали белком эндогликозидазы Н (Endo Н) в соотношении 1:100 и инкубировали при 4°C в течение ночи с образованием гомогенного дегликозилированного белка KLK5 для структурных исследований. Эндогликозидаза Н (Endo Н) представляет собой рекомбинантную гликозидазу, клонированную из *Streptomyces plicatus* и сверхэкспрессируемую в *E. coli*. Endo Н расщепляет хитобиозное ядро с высоким содержанием маннозы и ограниченное количество гибридных олигосахаридов из N-связанных гликопротеинов. Она не расщепляет сложные гликаны. Ферментативное расщепление происходит между двумя остатками N-ацетилглюкозамина в диацетилхитобиозном ядре олигосахарида, оставляя

один остаток N-ацетилглюкозамина на аспарагине. Эту стадию выполняли, чтобы гарантировать, что гомогенный KLK5 человека был доступен для кристаллографических исследований. KLK5 охарактеризовывали с помощью SDS-PAGE (Фигура 3), и он мигрировал в положение на геле, соответствующее ожидаемой молекулярной массе (MW) дегликозилированного белка ~ 25 кДа.

Кроличье Fab-антитело 10236 экспрессировали, как описано в Примере 6. Кроличье Fab-антитело 10236 (содержащее SEQ ID NO: 86 и 88) экспрессировали, как описано в примере 6. Короче говоря, экспрессионные конструкции, содержащие SEQ ID NO: 87 и 89, котрансфицировали при молярном соотношении 1:1. Кроличье Fab-антитело 10236 очищали путем пропускания кондиционированной среды над гранулами с Протеином G и элюировали 0,1 М глицином, pH 2,7. Фракции нейтрализовали добавлением 2М Tris-HCl, pH 8,5. Соответствующие отдельные белки диализовали в PBS, pH 7,2, концентрировали до ~ 10 мг/мл и хранили в замороженном виде при -80°C.

Готовили смесь KLK5 человека/кроличьего Fab-антитела 10236 с молярным соотношением 1,5:1, инкубировали при 4°C в течение ночи и очищали эксклюзионной хроматографией (20 mM Tris, 150 mM NaCl, буфер для элюирования pH 7,2). Образовавшийся комплекс выделяли и концентрировали до ~10 мг/мл перед кристаллизацией.

Условия кристаллизации комплекса KLK5 человека/кроличьего Fab-антитела 10236 определяли с использованием нескольких имеющихся в продаже скринингов для кристаллизации. Их проводили в формате сидячей капли с использованием 96-луночных 2-капельных кристаллизационных планшетов Swissci MRC (полученных от Molecular Dimensions, кат. MD11-00-100). Сначала емкости заполняли 75 мкл каждого кристаллизационного раствора в ячейках с использованием системы обработки жидкостей MicroLab STAR (Hamilton). Затем 300 нл комплекса KLK5 человека/Fab-антитела кролика 10236 и 300 нл растворов емкости распределяли в лунки кристаллизационных планшетов с помощью устройства обработки жидкости Mosquito (ТТР LabTech). Монокристалл получали в условиях 88 (лунка H4) набора ProComplex Suite, Qiagen). Это условие включает 1,4 М малоната натрия. Кристаллы на короткое время переносили в каплю, содержащую 1,4 М малоната натрия и 25% глицерина. Кристаллы мгновенно замораживали в жидком азоте, и данные дифракции собирали на линии пучка I03 (Diamond Light Source, Великобритания). Данные были проиндексированы и интегрированы с использованием XDS (Kabsch, W. XDS. Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)), с последующим масштабированием с помощью AIMLESS (Evans PR, Murshudov GN. How good are my data and what is the resolution? Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013;69(Pt 7):1204-1214). Структуру комплекса KLK5 человека/кроличьего Fab-антитела 10236 определяли путем молекулярной замены с использованием Phaser (McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, MD, Storoni, L.C., & Read, R.J. Phaser crystallographic software. J. Appl. Cryst. (2007). 40, 658-674) в программном комплексе Phenix (Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, et al. The Phenix software for automated determination of

macromolecular structures. *Methods*. 2011;55(1):94-106). В этой процедуре в качестве моделей молекулярной замены использовали структуры KLK5 и кроличьего Fab-антитела 10236, наблюдаемые в нашей кристаллической структуре KLK5 в комплексе с кроличьими Fab-антителами 10273 и 10236. Coot (P. Emsley; B. Lohkamp; W.G. Scott; Cowtan (2010). «Features and Development of Coot». *Acta Crystallographica*. D66: 486-501) и phenix.refine (Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J.J. Headd, N.W. Moriarty, M. Mustyakimov, T.C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P.H. Zwart, and P.D. Adams. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68, 352-67 (2012)) использовали в следующих циклах ручного завершения и уточнения модели. Таблица 4В показывает статистику уточнения на момент первого описания изобретения.

Таблица 4В

|  |                         |
|--|-------------------------|
| <b>Совокупность данных</b>                   |                         |
| Разрешение (Å)                               | 123,01-2,70 (2,83-2,70) |
| Пространственная группа                      | I 2 3                   |
| Параметры ячейки                             |                         |
| a=b=c (Å)                                    | 137,96                  |
| $\alpha=\beta=\gamma$ (°)                    | 90,00                   |
| R <sub>merge</sub> (%)                       | 5,70 (75,4)             |
| R <sub>meas</sub> (%)                        | 5,80 (77,4)             |
| R <sub>pim</sub>                             | 1,30 (16,7)             |
| Среднее I/σ(I)                               | 48,5 (6,6)              |
| Целостность (%)                              | 100,0 (100,0)           |
| Но. Уникальных отражений                     | 24174 (3190)            |
| Множественность                              | 40,8 (41,5)             |
| В-фактор Уилсона (Å <sup>2</sup> )           | 77,528                  |
|  |                         |
| <b>Уточнение статистики</b>                  |                         |
| Количество атомов белка/растворителя         | 4826/12                 |
| R <sub>work/free</sub> (%)                   | 21,19/25,8              |
| Количество отражений в 'свободном' состоянии | 3302                    |
| R. m. s. отклонения от идеальных значений    |                         |
| Связи (Å)                                    | 0,004                   |
| Углы (°)                                     | 0,764                   |
| Средний белковый В-фактор (Å <sup>2</sup> )  | 89,06                   |

Один комплекс KLK5 человека/Fab-антитела кролика 10236 наблюдали в кристаллической асимметричной единице. На Фигуре 4В показано, что сайт связывания антитела с KLK5 отличается от сайта связывания субстрата. NCONT в пакете программного обеспечения CCP4 использовали для определения эпитопа на KLK5, распознаваемого молекулой Fab10236. Нумерация аминокислот KLK5 основана на статье UnitProtKB Q9Y337 со стандартной нумерацией протеаз на основе химотрипсиногена в скобках.

Эпитоп KLK5 человека, связанный кроличьим Fab-антителом 10236 на расстоянии

контакта 4 Å, состоит из остатков Arg87 (36), Ala107 (56), Arg110 (59), Lys111 (60), Lys112 (61), Val113 (62), Val137. (86), Lys138 (87), Ser139 (88), Ile140 (89), Pro141 (90), His142 (91), Pro143 (92), Tyr145 (94), Ser146 (95), His147 (96) применительно к SEQ ID NO: 51, где номера в скобках соответствуют номенклатуре протеаз. Сайт связывания показан более подробно на Фигуре 4А.

Чтобы визуализировать сайт связывания Fab10236 по отношению к активному сайту KLK5, было сделано структурное наложение структуры KLK5-Fab10236, представленной в настоящем документе, на опубликованную структуру KLK5 с лейпептином, связанным в активном сайте (2PSX) (Фигура 4В). Наложение показывает, что Fab10236 не связывается с KLK5 в ядре активного сайта, на что указывает положение лейпептина (Фигура 4В), однако легкая цепь Fab10236 образует контакт с 99-петлей, которая формирует часть углубления активного сайта на KLK5. Было проведено сравнение структуры KLK5-Fab10236, представленной в настоящем документе, с ранее опубликованными структурами KLK5, как например, раскрытые как PDB ID 2PSX и 2PSY. Кристаллическая структура 2PSX показывает, что KLK5 связан с пептидным ингибитором протеазы лейпептином в его активном центре, в то время как кристаллическая структура 2PSY показывает KLK5, связанный с лейпептином, а также ион цинка рядом с активным центром. Известно, что цинк ингибирует KLK5 неконкурентным образом. Сравнение структур 2PSX и 2PSY показало, что цинк влияет на активность протеаз, индуцируя сдвиг в конформации остова 99-петли, что сопровождается существенными позиционными изменениями в боковых цепях His147(96) и His150(99). Движение остова 99-петли показано на структурном наложении (Фигура 4С, белый - без цинка и черный - с цинком), а также движения боковой цепи гистидина, в частности сдвиг His147 (99) из внешнего положения в отсутствие цинка во внутреннее положение, когда цинк связан (Фигура 4С, пунктирные стрелки указывают движения боковой цепи гистидина).

Структурное наложение структуры KLK5-Fab10236 со структурой лейпептина KLK без цинка (2PSX) подчеркивает движения остова 99-петли и движения боковой цепи His147 (96) и His150 (99) (Фигура 4D, 99-петля и боковые цепи гистидина показаны подробно - черный цвет представляет собой структуру KLK5-Fab10236, а белый цвет представляет собой структуру KLK5-лейпептин без цинка).

При связывании Fab10236 с KLK5 His147(96), расположенный в петле 99, не может принять конформацию, ранее наблюдаемую в кристаллической структуре 2PSX, поскольку это могло бы вызвать стерические столкновения с легкой цепью Fab (пунктирный квадрат, Фигура 4D). Чтобы приспособиться к связыванию Fab10236, 99-петля принимает другую конформацию, при которой His147(96) колеблется из внешнего положения во внутреннее положение (аналогично тому, что наблюдается при связывании цинка; Фигура 4D, пунктирная стрелка указывает на движение His147(96)). Одновременно боковая цепь His150(99) претерпевает изменение положения, сдвигая ее к карману S2, где она может блокировать связывание субстрата. Как показано на Фигуре 4D, карман S2

занят смоделированным лейпептином, а столкновение между боковой цепью His150(99) и лейпептином выделено белым пунктирным кружком.

Пример 8: Кристаллизация комплекса KLK5/Fab-антитело 10236/Fab-антитело 10273

KLK5 человека экспрессировали, как в Примере 7, за исключением того, что после загрузки супернатанта в катионообменную колонку HiTrap SP HP связанные белки элюировали градиентом буфера В (50 mM Tris, pH 7,0, 1 M NaCl) в 10 объемах колонки. Дальнейшую очистку, обработку эндогликозидазой и аналитическую характеристику проводили, как в Примере 7.

Кроличье Fab-антитело 10236 экспрессировали, как в Примере 6. Кроличье Fab-антитело 10273 (содержащее SEQ ID NO: 90 и 92) клонировали, как описано для кроличьего Fab-антитела 10236. Короче говоря, экспрессирующие конструкции, содержащие SEQ ID NO: 91 и 93, котрансформировали в молярном соотношении 1:1. Секретированные белки очищали путем пропускания кондиционированной среды через гранулы с Протеином G и элюировали 0,1 M глицином, pH 2,7. Фракции нейтрализовали добавлением 2M Tris-HCl, pH 8,5. Белок диализовали в PBS, pH 7,2, затем концентрировали до ~ 10 мг/мл и хранили в замороженном виде при -80°C.

Готовили комплекс 1:1,5:1,5 человеческое KLK5/кроличье Fab-антитело 10273/кроличье Fab-антитело 10236, инкубировали при 4°C в течение ночи и очищали эксклюзионной хроматографией (20 mM Tris, 150 mM NaCl, буфер для элюирования pH 7,2). Единственный пик, содержащий комплекс, перед кристаллизацией концентрировали до ~10,8 мг/мл.

Условия кристаллизации комплекса KLK5 человека /кроличьего Fab-антитела 10273/кроличьего Fab-антитела 10236 определяли с использованием нескольких имеющихся в продаже скринингов для кристаллизации. Их проводили в формате сидячей капли с использованием 96-луночных 2-капельных кристаллизационных планшетов Swissci MRC (полученных от Molecular Dimensions, кат. MD11-00-100). Сначала емкости заполняли 75 мкл каждого кристаллизационного раствора в ситах с использованием системы обработки жидкостей Microlab STAR (Hamilton). Затем 300 нл комплекса KLK5 человека/кроличьего Fab-антитела 10273/кроличьего Fab-антитела 10236 и 300 нл растворов емкости вносили в лунки кристаллизационных планшетов с помощью устройства обработки жидкости Mosquito (TTP LabTech). Монокристалл получали в условиях 16 (лунка B4) скрининга MIDAS+ HT-96 (Molecular Dimensions, кат. No. MD1-107). Это условие содержит 45% об./об. пропоксилата пентаэритрита (5/4), 0,2 M NaCl и 0,1 M моногидрата сольвата с pH 6. Кристалл мгновенно замораживали в жидком азоте, и данные дифракции собирали на линии пучка I03 (Diamond Light Source, Великобритания). Данные были проиндексированы и интегрированы с использованием XDS (Kabsch, W. XDS. Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)), с последующим масштабированием с помощью AIMLESS (2. Evans PR, Murshudov GN. How good are my data and what is the resolution? Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013;69(Pt 7):1204-1214). Структуру комплекса KLK5

человека/кроличьего Fab-антитела 10273/кроличьего Fab-антитела 10236 определяли путем молекулярной замены с использованием Phaser (McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., & Read, R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* (2007). 40, 658-674) в программном комплексе Phenix (Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, et al. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods.* 2011;55(1):94-106). В этой процедуре структуры KLK5 2PSX (Debela M, Goettig P, Magdolen V, Huber R, Schechter NM, Bode W. Structural basis of the zinc inhibition of human tissue kallikrein 5. 2011;55(1):94-106). 2007 Nov 2; 373(4):1017-31) и запатентованную модель Fab использовали в качестве молекулярных замещающих матриц. Coot (P. Emsley; B. Lohkamp; W.G. Scott; Cowtan (2010). «Features and Development of Coot». *Acta Crystallographica.* D66: 486-501) и phenix.refine (Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J.J. Headd, N.W. Moriarty, M. Mustyakimov, T.C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P.H. Zwart, and P.D. Adams. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68, 352-67 (2012)) использовались в следующих циклах ручного завершения и уточнения модели до получения приемлемой статистики Rwork, Rfree и Ramachandran (согласно анализу Molprobity (Williams et al. (2018) MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science* 27: 293-315)).

Комплекс KLK5 человека/Fab-антитела кролика 10273/ Fab-антитела кролика 10236 наблюдали в кристаллической асимметричной единице. NCONT в пакете программного обеспечения CCP4 использовали для определения эпитопов на KLK5, распознаваемых молекулами Fab10273 и Fab10236. Нумерация аминокислот KLK5 основана на статье UnitProtKB Q9Y337 со стандартной нумерацией протеаз на основе химотрипсिनогена в скобках. Таблица 4С показывает статистику уточнения на момент первого описания изобретения.

Таблица 4С

|                                    |                        |
|------------------------------------|------------------------|
| <b>Совокупность данных</b>         |                        |
| Разрешение (Å)                     | 87,77-2,45 (2,51-2,45) |
| Пространственная группа            | I 1 2 1                |
| Параметры ячейки                   |                        |
| a, b, c (Å)                        | 76,97, 93,19, 261,27   |
| β (°)                              | 91,00                  |
| R <sub>merge</sub> (%)             | 4,10 (52,9)            |
| R <sub>meas</sub> (%)              | 5,70 (72,4)            |
| R <sub>pin</sub>                   | 4,00 (49,2)            |
| Среднее I/σ(I)                     | 13,3 (1,9)             |
| Целостность (%)                    | 99,3 (99,9)            |
| Но. Уникальных отражений           | 67522 (4551)           |
| Множественность                    | 3,5 (3,4)              |
| В-фактор Уилсона (Å <sup>2</sup> ) | 62,535                 |
|                                    |                        |
| <b>Уточнение статистики</b>        |                        |

|  |             |
|--|-------------|
| Количество атомов белка/растворителя         | 7924/84     |
| Rwork/free (%)                               | 22,89/27,68 |
| Количество отражений в 'свободном' состоянии | 3302        |
| R.m.s. отклонения от идеальных значений      |             |
| Связи (Å)                                    | 0,011       |
| Углы (°)                                     | 1,158       |
| Средний белковый B-фактор (Å <sup>2</sup> )  | 69,33       |

При контактном расстоянии 4 Å эпитоп KLK5 человека, связанный с кроличьим Fab-антителом 10236, состоит из остатков Arg87 (36), Ala107 (56), Arg110 (59), Lys111 (60), Lys112 (61), Val113 (62), Val137 (86), Lys138 (87), Ser139 (88), Ile140 (89), Pro141 (90), His142 (91), Pro143 (92), Tyr145 (94), Ser146 (95) и His147 (96) применительно к SEQ ID NO: 51, а номера в скобках соответствуют номенклатуре протеаз. Сайт связывания показан более подробно на Фигуре 4D.

Как показано на Фигуре 5, антитела 10236 и 10273 имеют очень разные, неперекрывающиеся сайты связывания и связывают разные эпитопы на KLK5 человека.

Пример 8: Гуманизация и характеристика антитела 10236

Гуманизация Ab 10236

Кроличье антитело 10236 гуманизировали путем трансплантации CDR из V-областей кролика на каркасы V-области антитела зародышевой линии человека. Для восстановления активности антител в гуманизированной последовательности также сохраняли ряд каркасных остатков из V-областей кролика. Эти остатки отбирали с использованием протокола, изложенного Adair et al. (1991) (Humanized antibodies. WO91/09967). Выравнивания последовательностей V-области кроличьего антитела (донора) с последовательностями V-области зародышевой линии человека (акцептора) показаны на Фигурах 6 и 7 вместе со сконструированными гуманизированными последовательностями. CDR, трансплантированные от донора на акцепторные последовательности, соответствуют определению Kabat (Kabat et al., 1987), за исключением CDR-H1, где используется комбинированное определение Chothia/Kabat (см. Adair et al., 1991 Humanized antibodies. WO91/09967).

Для антитела 10236 в качестве акцептора для CDR легкой цепи была выбрана V-область человека IGKV1-6 плюс J-область JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>). Каркасные остатки в гуманизированных трансплантатах легкой цепи 10236 все происходят из гена зародышевой линии человека, за исключением одного или более остатков из группы, включающей остатки 2, 3 и 63, где донорные остатки тирозин (Y2), аспарагиновая кислота (D3) и лизин (K63) применительно к SEQ ID NO: 15 были соответственно сохранены (Фигура 6). Сохранение донорных остатков Y2 и D3 было необходимо для наивысшей аффинности связывания с KLK-5 человека.

Человеческая V-область IGHV4-4 плюс J-область JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) была выбрана в качестве акцептора для CDR тяжелой цепи антитела 10236. Как и во многих кроличьих антителах, ген VH антитела 10236 короче, чем выбранный человеческий акцептор. При выравнивании с акцепторной последовательностью человека

в каркасной области 1 области VH антитела 10236 отсутствует N-концевой остаток, который сохраняется в гуманизированном антителе (Фигура 7). Каркас 3 кроличьей области VH 10236 также лишен двух остатков (75 и 76) в петле между цепями D и E бета-листа: в гуманизированных трансплантатах пробел заполнен соответствующими остатками (лизин 75, K75; аспарагин 76, N76) из выбранной акцепторной последовательности человека (Фигура 7) или, альтернативно, лизином и треонином (лизин 75, K75; треонин 76, T76). Каркасные остатки в гуманизированных трансплантатах тяжелой цепи 10236 все происходят из последовательности генов зародышевой линии человека, за исключением одного или более остатков из группы, включающей остатки 67, 71, 73 и 78, где донорные остатки фенилаланин (F67), глутамин (Q71), серин (S73) и валин (V78) применительно к SEQ ID NO: 39 были соответственно сохранены. Сохранение донорных остатков Q71, S73 и V78 было необходимо для наивысшей аффинности связывания с KLK-5 человека. Остаток глутамина в положении 1 каркаса человека был заменен глутаминовой кислотой (E1), чтобы обеспечить экспрессию и очистку гомогенного продукта: часто сообщается о превращении глутамина в пироглутамат на N-конце антител и фрагментов антител. Теоретический pI гуманизированных антител 10236 составляет от ~6,3 до 6,6. Чтобы облегчить удаление примесей с помощью ионообменной хроматографии во время последующей обработки, pI увеличивали путем мутации остатка 24 в CDRL1 трансплантата gL6 с глутамина (Q) на остаток аргинина (R) или лизина (K).

Гуманизированные трансплантаты тестировали с кроличьим/человеческим антителом 10236, чтобы оценить, не повлияла ли на их аффинность процедура гуманизации. Кроличье/человеческое антитело 10236 клонировали на модифицированной версии человеческого вектора СКарра, содержащей мутацию S171C, для повторного создания дополнительной дисульфидной связи, обнаруженной в легких цепях VK кролика, отсутствующей в константных областях человека, что приводит к получению кроличьего/человеческого антитела 10236 согласно SEQ ID NO: 96 и 97.

Измерение аффинности гуманизированных трансплантатов Ab 10236.

Козье антитело против Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с помощью химического связывания с амином до уровня приблизительно 6000 RU. Каждый цикл анализа состоял из захвата анти-KLK5 IgG из супернатантов на поверхность анти-Fc, инъекции аналита KLK5 (приготовленного на месте) в течение 180 с при скорости 30 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 600 с. В конце каждого цикла поверхность регенерировали со скоростью потока 10 мкл/мин, используя 60-секундную инъекцию 50 mM HCl, затем 30-секундную инъекцию 5 mM NaOH и последнюю 60-секундную инъекцию 50 mM HCl. KLK5 человека титровали от 20 нМ до 0,08 нМ (5×3-кратных серийных разведений) для супернатанта в рабочем буфере HBS-EP+ (GE Healthcare®), дополненном до конечной концентрации 300 mM NaCl. Ввод пустой пробы буфера был включен, чтобы вычистить фон прибора и отклонение показаний. Кинетические параметры определяли с использованием модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (версия 3.0).

Эксперименты проводили при 25°C.

Химерные антитела кролика/человека анализировали в начале и в конце анализа и показали хорошую точность. Данные высокого качества были получены для всех образцов, как показано в Таблице 5.

Таблица 5

| <b>Антитело 10236</b>       | <b>Легкая цепь Донорные остатки</b> | <b>Легкая цепь Мутация</b> | <b>Тяжелая цепь Донорные остатки</b> | <b>ka (1/Мс)</b> | <b>kd (1/с)</b> | <b>KD (пМ)</b> |
|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|
| Химера кролик/человек 10236 | -                                   |                            | -                                    | 2,69E+06         | 4,51E-04        | <b>167,9</b>   |
| Химера кролик/человек 10236 | -                                   |                            | -                                    | 2,70E+06         | 44,09E-04       | <b>151,7</b>   |
| Химера кролик/мышь 10236*   |                                     |                            |                                      | 3,00E+06         | 5,17E-04        | <b>172,3</b>   |
| gL5 gH9                     | Y2, D3, K63                         |                            | Q71, S73, T76, V78                   | 1,92E+06         | 9,29E-04        | <b>484,5</b>   |
| gL5 gH10                    | Y2, D3, K63                         |                            | S73, T76, V78                        | 1,97E+06         | 1,07E-03        | <b>545,6</b>   |
| gL5 gH11                    | Y2, D3, K63                         |                            | Q71, T76, V78                        | 1,69E+06         | 8,11E-04        | <b>480,6</b>   |
| gL5 gH12                    | Y2, D3, K63                         |                            | Q71, S73, V78                        | 2,03E+06         | 6,69E-04        | <b>330,6</b>   |
| gL6 gH9                     | Y2, D3                              |                            | Q71, S73, T76, V78                   | 1,91E+06         | 9,10E-04        | <b>475,2</b>   |
| gL6 gH10                    | Y2, D3                              |                            | S73, T76, V78                        | 1,93E+06         | 1,05E-03        | <b>541,5</b>   |
| gL6 gH11                    | Y2, D3                              |                            | Q71, T76, V78                        | 1,69E+06         | 8,02E-04        | <b>475,4</b>   |
| gL6 gH12                    | Y2, D3                              |                            | Q71, S73, V78                        | 2,04E+06         | 6,60E-04        | <b>323,9</b>   |
| gL6 gH12 <sup>§</sup>       | Y2, D3                              |                            | Q71, S73, V78                        |                  |                 | <b>299</b>     |
| gL6 Q24R gH12               | Y2, D3                              | Q24R                       | Q71, S73, V78                        | 2,01E+06         | 6,69E-04        | <b>333,4</b>   |
| gL6 Q24K gH12               | Y2, D3                              | Q24K                       | Q71, S73, V78                        | 2,04E+06         | 6,87E-04        | <b>336,5</b>   |

\* как описано в примере 4 и в Таблице 3; <sup>§</sup>: среднее значение за 2 прогона (Таблица 15).

Как показано в Таблице 5, трансплантат 10236gL6gH12 с мутациями Q24R/K или без них сохранял высокую аффинность к KLK5 человека.

Профилирование гуманизированных антител

KLK5 селективность

Проводили серию исследований, чтобы гарантировать, что гуманизация кроличьего антитела 10236 не изменяет селективность KLK5 по сравнению с другими

калликреинами, не снижает аффинность или ингибирующую активность.

Затем очищенные антитела подвергали скринингу для подтверждения их ингибирующей активности в отношении KLK5 в соответствии со способами, описанными в Примере 4. Антитела тестировали в 10-точечной серии полулогарифмических разведений в диапазоне от 600 нМ до 20 пМ. Используя Beckman Coulter FXTM и Multidrop System, 5 мкл каждого антитела переносили в черные 384-луночные планшеты для анализа (Corning<sup>TM</sup>, кат. № 3575) и 15 мкл выбранных активных рекомбинантных ферментов калликреина в буфере для анализа А (150 мМ NaCl, 50 мМ Tris, 200 мМ EDTA, 0,05% (об./об.) Tween-20, pH 7,6 добавляли в соответствующие лунки для достижения следующих конечных концентраций анализа: 60 пМ KLK5 человека (UCB), 250 пМ KLK7 (UCB), 500 пМ KLK2 (R&D Systems<sup>TM</sup>), 30 пМ KLK4 (UCB), 30 пМ KLK5 яванского макака (UCB), 500 пМ яванского макака KLK7, 30 пМ KLK5 мыши (UCB) и 5 нМ KLK7 мыши (UCB). Ферменты, приготовленные в UCB, указаны в скобках и приготовлены, как описано выше в Примере 1. В скобках указан источник коммерчески доступных ферментов.

В лунки добавляли только 20 мкл аналитического буфера А для достижения 0% активности. LEKTI D5 Fc кролика (UCB, полученный, как описано выше) использовали в качестве эталона для ингибирующей активности; 5 мкл LEKTI D5 Fc кролика в том же диапазоне концентраций, что и для антитела 10236, добавляли к 15 мкл ферментов калликреина. 15 мкл KLK5 человека, добавленного к 5 мкл аналитического буфера А, использовали в качестве эталона активности 100%.

Антитела и калликреины инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. С помощью мультикапли добавляли следующие пептидные субстраты: Вос-VPR-AMC (Cambridge Research Biochemicals<sup>TM</sup>) для KLK5 человека (300 мкМ), KLK2 человека (30 мкМ), KLK5 мыши (300 мкМ) и KLK5 яванского макака (450 мкМ); KHLF-AMC (Cambridge Research Biochemicals<sup>TM</sup>) для KLK7 человека и яванского макака (90 мкМ и 150 мкМ, соответственно), PFR-AMC (R&D Systems<sup>TM</sup>) для KLK4 человека (200 мкМ) и Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH<sub>2</sub> (R&D Systems<sup>TM</sup>) для KLK7 мыши (150 мкМ). Образцы инкубировали в течение 4 часов и считывали на планшет-ридере Pherastar FSX (BMG Labtech<sup>TM</sup>) при  $\lambda_{ex}$ 380 нм и  $\lambda_{em}$ 430 нм для Вос-VPR-AMC, PFR-AMC и KHLF-AMC и при  $\lambda_{ex}$ 320 нм и  $\lambda_{em}$ 400 нм для Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH<sub>2</sub>. Данные анализировали для определения процента ингибирования, как описано в примере 3. Данные были построены в зависимости от концентрации тестируемого антитела и 4-параметрической сигмовидной кривой для определения IC<sub>50</sub> (Genedata Screener<sup>TM</sup>).

Гуманизированные трансплантаты Ab 10236 сохраняли специфическую ингибирующую активность в отношении KLK5 и демонстрировали незначительное ингибирование или отсутствие ингибирования в отношении других протестированных членов семейства KLK. Ab 10236 gL6gH12 является мощным ингибитором KLK5 человека и яванского макака (Таблица 6, каждое значение является индивидуальным измерением), сохраняющим эффективность как у родительского негуманизированного

антитела. Никакой активности (т. е. ниже порога 40% в соответствии с критериями отбора в примере 2) не наблюдалось в отношении KLK2, 4 и 7 человека, KLK7 яванского макака, KLK5 мыши или KLK7 мыши (Фигура 8).

Таблица 6

|                            | <b>Hu KLK5 IC50</b> | <b>CynoKLK5 IC50</b> |
|----------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Ab10236gL6gH12</b>      | 7,65E-10            | 1,05E-10             |
|                            | 1,42E-10            | 4,77E-10             |
|                            | 6,63E-10            | 1,30E-10             |
|                            | 5,86E-10            | 8,24E-11             |
| <b>ЛЕКТИ D5 Fc кролика</b> | 1,03E-10            | n/a                  |
|                            | 7,44E-11            |                      |

n/a=недоступно

Связывание ЛЕКТИ с KLK5 в присутствии гуманизированного антитела 10236

Эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом (SPR), как описано в Примере 5, проводили для определения аффинности ЛЕКТИ к комплексу KLK5 с гуманизированным антителом 10236 gL6gH12, как это было выполнено для родительского кроличьего антитела 10236.

Использовали экспериментальные условия, описанные в примере 5, за исключением того, что была подготовлена поверхность чипа против человеческого Fc, и результаты приведены в Таблице 6.

Подобно родительскому кроличьему антителу 10236, слитый белок LEKTID5 Fab был способен связываться с KLK5, который уже находится в комплексе с антителом 10236 gL6gH12, но с более низкой аффинностью, чем индивидуально KLK5 человека (Таблица 7, 540 нМ по сравнению с 40 пМ).

Таблица 7

|                             | <b>ka (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b> | <b>kd (s<sup>-1</sup>)</b> | <b>KD (M)</b> |
|-----------------------------|--|----------------------------|---------------|
| Только KLK5 человека        | 5,70E+05                                 | 2,30E-05                   | 4,00E-11      |
| 10236 gL6gH12+KLK5 человека | 2,90E+04                                 | 1,60E-03                   | 5,40E-07      |

Клеточный анализ KLK5-PAR2

Было показано, что KLK5 активирует рецепторы активируемого протеазой рецептора-2 (PAR2) на поверхности кератиноцитов (K. Oikonomopoulou et al. Kallikrein-mediated cell signaling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). Biol Chem, 387 (2006), pp. 817-824). Это приводит к воспалительному каскаду, управляемому NFkB, и высвобождению соответствующих цитокинов, таких как TSLP.

Поскольку PAR2 представляет собой Gq-связанный рецептор, связанный с G-белком (GPCR), активация приводит к передаче сигналов фосфолипазы и образованию инозитолмонофосфата (IP-1). Активацию эндогенного PAR2, экспрессируемого на кератиноцитах HaCat при воздействии KLK5, контролировали путем детектирования IP1 с использованием набора для анализа от Cisbio.

Конфлюэнтные клетки HaCat собирали и высевали на планшет 384 Fluoblock (Corning™) по 10000 клеток/лунку и культивировали в среде DMEM+10% FBS+2 mM L-

глутамин+Pen/Strep (Life Technologies™) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи, после чего их обрабатывали в соответствии с протоколом анализа IP-One Gq (Cisbio™). Антитела (антитело 10236 gL6gH12 и отрицательный IgG4 A33 человека) для тестирования серийно разводили в 1-кратном стимулирующем буфере В (набор для анализа IP-One Gq, Cisbio™) от максимальной концентрации 2 мкМ и инкубированы в течение 1 часа при 37°C в присутствии 200 нМ KLK5 человека. Смесь антитело/KLK5 добавляли к клеткам HaCat, и определяли инозитол-1 фосфат (IP1) в соответствии с протоколом анализа IP-One Gq со считыванием флуоресценции при 665 нМ и 620 нМ на планшет-ридере Synergy Neo.

Антитело 10236 gL6gH12 было способно почти полностью ингибировать высвобождение IP1 из клеток HaCat, обработанных KLK5 (Фигура 9), демонстрируя аналогичное максимальное ингибирование высвобождения IP1 как у белка LEKTI D5 кроличий Fc.

#### Механизм действия антитела 10236

Были проведены эксперименты по выяснению механизма действия ингибирующих антител. Неконкурентные ингибиторы ферментов снижают активность фермента, но способны одинаково хорошо связывать фермент в присутствии субстрата или в его отсутствие. И ингибитор, и субстрат способны одновременно связывать фермент, но продукт не может образовываться, в результате чего комплекс фермент-субстрат-ингибитор может распадаться только на комплексы фермент-субстрат или фермент-ингибитор. При использовании неконкурентных ингибиторов скорость ингибирования не зависит от увеличения концентрации субстрата.

Антитело 10236 gL6gH12 или белок LEKTI D5 кроличий Fc готовили в буфере для анализа (150 мМ NaCl, 50 мМ Tris, 200 мкМ EDTA, 0,05% (об./об.) Tween-20, pH 7,6) при 300, 30 или 3-кратном значении IC<sub>50</sub> для KLK5 человека. 10 мкл антитела 10236 gL6gH12 добавляли в 384-луночный аналитический планшет Corning с низким связыванием (Corning®). В планшет добавляли 10 мкл 5-точечного серийного разведения 30 мМ - 300 мкМ Вос-VPR-AMC (Cambridge Research Biochemicals™). Для одновременного запуска реакции использовали планшет-ридер Pherastar FSX (BMG Labtech™) путем введения 10 мкл либо 1,8 нМ KLK5 человека (Вос-VPR-AMC < 1 мМ), либо 180 пМ KLK5 (Вос-VPR-AMC > 1 мМ) и контролировали флуоресценцию (λ<sub>ex</sub>380 нм λ<sub>em</sub>430 нм) каждые 30 секунд. Конечные реакционные условия содержали антитело 10236 gL6gH12 или белок LEKTI D5 Fc кролика в количестве, в 100, 10 или 1 раз превышающем значение IC<sub>50</sub> для KLK5 человека, последовательное разведение Вос-VPR-AMC от 10 мМ до 100 мкМ и 60 или 600 пМ KLK5 человека. Антитело заменяли аналитическим буфером, чтобы установить неингибируемый контроль, а фермент заменяли буфером, чтобы установить фоновый контроль.

Данные анализировали путем вычитания фоновой флуоресценции в каждый момент времени и построения графика зависимости флуоресценции от времени. Данные соответствовали следующему уравнению (GraphPad Prism®, программное обеспечение GraphPad):

$$y = v_s \cdot x + \left( \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot x}) \right)$$

Это позволило определить  $k_{obs}$ , наблюдаемую скорость зависящего от времени ингибирования, где  $v_i$  - начальная скорость реакции, а  $v_s$  - конечная скорость. Значения для  $k_{obs}$  наносили на график в зависимости от концентрации субстрата, чтобы определить механизм ингибирования.

Скорость ингибирования KLK5 человека антителом 10236 gL6gH12 (Фигура 10А) и кроличьим антителом 10236 (Фигура 10В) остается неизменной при увеличении концентрации субстрата, демонстрируя, что антитело 10236 gL6gH12 является неконкурентным ингибитором KLK5 человека. Напротив, белок LEKTID5 Fc кролика демонстрирует снижение скорости ингибирования с увеличением концентрации субстрата, демонстрируя, что он является конкурентным ингибитором KLK5 человека.

#### Пример 9: Исследования системы кожи *in vitro*

Систему EpiDermFT для полнослойной кожи человека *in vitro* (корпорация MatTek™; Morizane, Shin et al. «Kallikrein expression and cathelicidin processing are independently controlled in keratinocytes by calcium, vitamin D(3), and retinoic acid.» The Journal of investigative dermatology vol. 130,5 (2010): 1297-306. doi:10.1038/jid.2009.435) использовали для демонстрации функционального действия антитела 10236 gL6gH12 IgG4P на KLK5 человека.

MC903, аналог витамина D3, использовали для лечения системы кожи *in vitro*, поскольку *in vivo* он индуцирует фенотип, подобный атопическому дерматиту (Naidoo, Karmella et al. «Eosinophils Determine Dermal Thickening and Water Loss in an MC903 Model of Atopic Dermatitis.» The Journal of investigative dermatology vol. 138,12 (2018): 2606-2616. doi:10.1016/j.jid.2018.06.168).

Реконструированную полнослойную ткань кожи EpiDermFT™ уравнивали в среде для анализа EFT-400-ASY (MatTek Corporation™) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. В день 0 среду удаляли из лунок и заменяли 2,5 мл среды EFT-400-ASY. Ткани обрабатывали местно 25 мкл только среды; MC903 (Tocris Bioscience®), разведенным в среде EFT-400-ASY, чтобы получить конечную концентрацию 2 нмоль; MC903, разведенным в среде (2 нмоль) плюс либо 10 мкг/мл антитела 10236 gL6gH12IgG4P, либо изотипического контроля hIgG4P (собственного производства). Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Базальную среду заменяли каждый день, и местное лечение применяли каждый день. Эксперимент останавливали на 4-й день.

Ткани удаляли из трансвеллов (Costar Snapwell™), разрезали пополам с помощью скальпеля в стерильной чашке Петри и помещали в матрицу для заливки тканей ОКТ (Cellpath™) для подготовки к гистологическому анализу. Срезы размером 6 мкм были вырезаны и окрашены для оценки структурной целостности с использованием гематоксилина и эозина, детектирования KLK5 с помощью иммунофлуоресценции и оценки активности протеазы с помощью зимографического анализа *in situ*.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания KLK5 срезы высушивали на воздухе в

течение 10 минут при комнатной температуре, промывали 0,1% Tween 20 в PBS 3 раза и один раз в PBS. Затем срезы блокировали в 5% BSA в PBS в течение 10 минут. Срезы обводили с помощью ручки PAP и инкубировали с мышинным антителом против huKLK5 (Abcam®) при 10 мкг/мл в течение 1 часа при 37°C в увлажняемой камере. После инкубации с антителами срезы снова промывали и фиксировали в 4% PFA в течение 10 минут. Затем срезы инкубировали со вторичным козым антимышиным IgG Alexa 546 (Life Technologies®) в течение 1 часа при 37°C в увлажняемой камере. Срезы промывали и монтировали с использованием гистологической среды, содержащей DAPI (Vector Labs™). Флуоресцентные изображения получали на Zeiss Axio Scan при 20-кратном увеличении.

Для зимографии *in situ* срезы сушили на воздухе в течение 10 минут при комнатной температуре, промывали один раз 2% tween в PBS и 3 раза в PBS. Затем срезы инкубировали с флуоресцентным субстратом казеин-BODIPY-FL (Invitrogen®) в концентрации 10 мкг/мл в течение 3 часов при 37°C в увлажняемой камере. Срезы промывали 3 раза в PBS и монтировали с использованием гистологической среды, содержащей DAPI (Vector Labs™). Флуоресцентные изображения были получены сразу же на Zeiss Axio Scan при 20-кратном увеличении.

Сравнение структуры ткани после обработки MC903 с антителом 10236 gL6gH12IgG4P и без него демонстрирует, что ингибирование KLK может предотвратить разрушение рогового слоя в модели кожи человека (Фиг. 11).

Более того, хотя экспрессия KLK5 не изменялась, активность сериновой протеазы снижалась в кожных системах, обработанных антителом 10236 gL6gH12IgG4P (данные не представлены).

Пример 10: Зимография *in situ* в образцах атопического дерматита

Биоптаты кожи (Национальный Биосервис России) от пациентов с атопическим дерматитом средней и тяжелой степени тестировали для оценки ингибирующего действия антител против KLK5. Биопсии (4 мм) помещали в матрицу для заливки тканей ОКТ (Cellpath™) и хранили при -80°C. Срезы ткани вырезали (6 мкм) и использовали для зимографического анализа *in situ*, как описано ранее в примере 9, с использованием вместо казеина-BODIPY-FL флуоресцентно гасящего субстрата [5-FAM]-FVNRSYPP-Lys(Dabcyl)-амид в конечной аналитической концентрации 20 мкм. Расщепление субстрата в срезах ткани приводит к флуоресценции, которая регистрируется как флуоресцентные изображения на Zeiss Axio Scan™ при 20-кратном увеличении.

Данные показывают, что предварительная инкубация срезов тканей атопического дерматита с антителом 10236 gL6gH12IgG4P может снижать уровни активности сериновой протеазы по сравнению с срезами, обработанными без ингибитора (Фиг. 12), о чем свидетельствует существенное снижение белого окрашивания рогового слоя (самый верхний слой кожи эпидермиса) и в зернистом слое (непосредственно под роговым слоем).

Пример 11: Биофизическая характеристика гуманизированных антител

Биофизические свойства 10236 gL6gH12 (в виде изотипов IgG4P и IgG1) определяли для оценки способности к развитию. Это включало термическую стабильность ( $T_m$ ), экспериментальную  $pI$ , кажущуюся гидрофобность, растворимость (анализ преципитации ПЭГ) и оценку самовзаимодействия (склонность к агрегации) с помощью AC-SINS.

Кроме того, мутантное антитело 10236 gL6N94D gH12 тестировали для оценки химической стабильности, то есть склонности к дезамидированию мотива Asn(94)Ser (применительно к SEQ ID NO: 15) в CDR3 легкой цепи (Таблица 8).

Таблица 8.

|                             | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $KD$ (M) |
|-----------------------------|--|--------------------------|----------|
| Только KLK5 человека        | 5,70E+05                                 | 2,30E-05                 | 4,00E-11 |
| 10236 gL6gH12+KLK5 человека | 2,90E+04                                 | 1,60E-03                 | 5,40E-07 |

#### Характеристика масс-спектрометрией

Идентичность антител 10236 IgG1 и IgG4P подтверждали измерением интактной массы тяжелых и легких цепей с помощью LC-MS с использованием системы Waters ACQUITY UPLC с масс-спектрометром Xevo® G2 Q-ToF. Образцы (~5 мкг) восстанавливали 5 mM Tris(2-карбокситил)фосфина (TCEP) в 150 mM ацетата аммония при 37°C в течение 40 минут. Колонка LC представляла собой Waters BioResolve™ RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2,7 мкм, выдержанные при 80°C, уравновешенные 95% растворителем А (вода/0,02% трифторуксусной кислоты (TFA)/0,08% муравьиной кислоты) и 5% растворителем В (95% ацетонитрила/5% воды/0,02% ТФУ/0,08% муравьиной кислоты) при скорости потока 0,6 мл/мин. Белки элюировали градиентом от 5% до 50% растворителя В в течение 8,8 минут с последующей промывкой 95% растворителем В и повторным уравновешиванием. УФ-данные получали при 280 нм. Условия MS были следующими: Ионный режим: положительный ион ESI, режим разрешения, диапазон масс: 400-5000  $m/z$  и внешняя калибровка с NaI. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Waters MassLynx™ и MaxEnt.

Никакой разницы между ожидаемой и наблюдаемой молекулярной массой по данным масс-спектрометрии не наблюдалось (Таблица 9).

Таблица 9.

| Описание антитела |              | Легкая цепь (Да) |           |        | Тяжелая цепь (Да) |           |          |
|-------------------|--------------|------------------|-----------|--------|-------------------|-----------|----------|
|                   |              | Ожидали          | Наблюдала | Дельта | Ожидал и          | Наблюдала | Дельта а |
| hIgG4P            | 10236gL6gH12 | 23476,1          | 23475,4   | -0,7   | 49792,7           | 49793,6   | 0,9      |
| hIgG1             | 10236gL6gH12 | 23474,6          | 23476,1   | -1,5   | 49947,2           | 49948     | -0,8     |

#### Измерения термостабильности ( $T_m$ )

Температуру плавления ( $T_m$ ) или температуру в середине разворачивания определяли с использованием анализа теплового сдвига.

Для этого анализа использовали флуоресцентный краситель SYPRO® оранжевый для наблюдения за процессом разворачивания белка путем связывания с гидрофобными областями, которые открываются при повышении температуры. Реакционная смесь содержала 5 мкл 30-кратного раствора SYPRO® Orange Protein Gel Stain (ThermoFisher Scientific, S6651), разбавленного из 5000x концентрата тестовым буфером. 45 мкл образца с концентрацией 0,2 мг/мл в PBS, pH 7,4, или 50 mM ацетата натрия, 125 mM хлорида натрия, pH 5, добавляли к красителю и смешивали (это стандартные буферы до приготовления лекарственной формы) 10 мкл этого раствора распределяли в четырехкратном повторении в 384-луночный оптический планшет для ПЦР и запускали на системе ПЦР в реальном времени QuantStudio 7 (ThermoFisher™). Нагревание системы ПЦР устанавливали на 20°C и повышали до 99°C со скоростью 1,1°C/мин. Устройство с зарядовой связью отслеживало изменения флуоресценции в лунках. Наносили на график увеличение интенсивности флуоресценции, точку перегиба наклона(ов) использовали для получения кажущейся средней температуры (T<sub>m</sub>). Данные представлены в Таблице 10.

Для 10236gL6gH12 (IgG4P) наблюдали два перехода разворачивания. Первый можно отнести к домену CH2, а второй можно отнести к среднему показателю T<sub>m</sub> домена разворачивания Fab и домена CH3. Для молекулы IgG1 наблюдали один домен разворачивания, связанный со средним значением T<sub>m</sub> доменов CH2 и Fab. Это соответствует литературным данным (Garber E. Demerest SJ. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr;355(3):751-7).

Таблица 10.

| Описание антитела |                  | PBS pH 7,4                       |     |                                |     |                                  |
|-------------------|------------------|----------------------------------|-----|--------------------------------|-----|----------------------------------|
|                   |                  | Fab домен<br>T <sub>m</sub> (°C) | SD  | CH2 домен T <sub>m</sub> (°C)  | SD  | CH3 домен<br>T <sub>m</sub> (°C) |
| hIgG4P            | 10236<br>gL6gH12 | 74                               | 0,0 | 66,3                           | 0,1 | Не<br>измеряли                   |
| hIgG1             | 10236<br>gL6gH12 | 71,5                             | 0,9 | Перекрывание с Fab-<br>доменом |     | Не<br>измеряли                   |

Экспериментальное измерение изоэлектрической точки (pI)

Для экспериментального определения pI использовали систему капиллярной изоэлектрической фокусировки iCE3™ с визуализацией всего капилляра (cIEF) (ProteinSimple). Образцы готовили путем смешивания следующего: 30 мкл образца (из исходного раствора с концентрацией 1 мг/мл в воде для ВЭЖХ), 35 мкл 1% раствора метилцеллюлозы (ProteinSimple, 101876), 4 мкл фармакологических препаратов с pH 3-10 (ProteinSimple, 042- 848), 0,5 мкл 4,65, 0,5 мкл 9,77 синтетических маркеров pI (ProteinSimple, 102223 и 102219) и 12,5 мкл 8 М раствора мочевины (Sigma Aldrich®). Для доведения конечного объема до 100 мкл использовали воду для ВЭЖХ. Образцы фокусировали в течение 1 минуты при 1,5 кВ, а затем в течение 5 минут при 3 кВ, 280-нм изображения капилляра были получены с использованием программного обеспечения Protein Simple. Полученные электрофореграммы анализировали с использованием программного обеспечения iCE3 и присваивали значения pI (линейная зависимость между

маркерами pI). Данные обобщены в Таблице 11.

Было обнаружено, что pI 10236gL6gH12 (hIgG4P) ниже, чем у соответствующей молекулы IgG1. Можно было бы предусмотреть, что не будет проблем с разработкой/производством любой из молекул, а pI выше, чем у буферов, обычно используемых для приготовления лекарственной формы (~pH 5).

Таблица 11

| Описание антитела |               | pI  |
|-------------------|---------------|-----|
| IgG4P             | 10236 gL6gH12 | 6,7 |
| IgG1              | 10236 gL6gH12 | 7,5 |

#### Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC)

Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC) разделяет молекулы в порядке возрастания гидрофобности. Молекулы связываются с гидрофобной неподвижной фазой в присутствии высоких концентраций полярных солей и десорбируются в подвижную фазу по мере уменьшения концентрации соли. Более длительное время удерживания соответствует большей гидрофобности.

Два изотипа (IgG4P и IgG1) 10236 gL6gH12 в концентрации 2 мг/мл разбавляли 1:2 1,6 М сульфатом аммония и PBS (pH 7,4). 10 мкг (10 мкл) образца вводили в колонку Dionex ProPac™ HIC-10 (100 мм x 4,6 мм), соединенных последовательно с бинарной ВЭЖХ Agilent 1200 с флуоресцентным детектором. Разделение контролировали по собственной флуоресценции (длины волн возбуждения и испускания 280 нм и 340 нм, соответственно). Используя буфер А (0,8 М сульфат аммония, 100 mM фосфат, pH 7,4) и буфер В (100 mM фосфат, pH 7,4), образец анализировали с использованием градиента элюирования следующим образом: (i) 2-минутная выдержка при 0% В, (ii) линейный градиент от 0 до 100% В за 30 минут (0,8 мл/мин) (iii) колонку промывали 100% В в течение 2 минут и повторно уравнивали в 0% В в течение 10 минут перед следующей инъекцией образца. Температуру колонки поддерживали на уровне 20°C. Время удерживания (в минутах) показано в Таблице 12.

Таблица 12.

| Описание антитела |               | Время удерживания основного пика (мин) |
|-------------------|---------------|--|
| IgG4P             | 10236gL6gH12  | 12,8                                   |
| IgG1              | 10236 gL6gH12 | 11,0                                   |

Имелась небольшая разница во времени удерживания между двумя молекулами, где 10236 gL6gH12 (IgG4P) проявляли несколько большую кажущуюся гидрофобность, чем соответствующий формат IgG1. Ожидается, что обе молекулы будут иметь среднюю склонность к агрегации на основании результатов других коммерческих антител. (Jain et al «Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape» Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jan 31;114(5):944-949. doi: 10.1073/pnas.1616408114. Epub 2017 Jan 17).

Измерение растворимости с использованием измерения полиэтиленгликоля (ПЭГ)

Понимание коллоидной стабильности (растворимости) можно получить, изучив влияние осаждения полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ использовали для снижения растворимости белка количественно определяемым образом путем увеличения концентрации ПЭГ (масса/объем) и измерения количества белка, оставшегося в растворе. Этот анализ служит для имитации эффекта растворимости в высокой концентрации без использования обычных методов концентрирования.

Исходный 40% раствор ПЭГ 3350 (Merck, 202444) (мас./об.) готовили в PBS, pH 7,4; 50 mM ацетата натрия, 125 mM хлорида натрия, pH 5 (обычные буферы для хранения перед составом) и 50 mM гистидина, 250 mM пролина, pH 5,5 (обычный буфер для состава). Серийное титрование выполняли с помощью робота для работы с жидкостями Assist Plus (INTEGRA, 4505), что дало диапазон от 40% до 15,4% ПЭГ 3350. Чтобы свести к минимуму неравновесное осаждение, подготовка образцов заключалась в смешивании растворов белка и ПЭГ в объемном соотношении 1:1. 35 мкл исходных растворов ПЭГ 3350 добавляли в 96-луночный планшет для ПЦР с v-образным дном (от A1 до H1) с помощью робота для работы с жидкостями. 35 мкл раствора образца с концентрацией 2 мг/мл добавляли к исходным растворам ПЭГ, что приводило к тестовой концентрации 1 мг/мл. Этот раствор смешивали автоматическим медленным повторным пипетированием и инкубировали при 37°C в течение 0,5 ч для повторного растворения любых неравновесных агрегатов. Затем образцы инкубировали при 20°C в течение 24 часов. Затем планшет центрифугировали при 4000 g в течение 1 ч при 20°C. 50 мкл супернатанта вносили в микропланшет UV-Star®, половинная площадь, 96-луночный, µClear®, микропланшет (Greiner, 675801). Концентрации белка определяли с помощью УФ-спектрофотометрии при 280 нм с использованием многофункционального считывателя микропланшетов FLUOstar®Omega (BMG LABTECH). Полученные значения наносили на график с использованием Graphpad prism ver 7.04, показатель средней точки ПЭГ (PEGmdpnt) получали из средней точки сигмоидальной зависимости доза-реакция (переменный наклон).

Данные представлены в Таблице 13. Чем выше средняя точка ПЭГ (%); тем большая вероятность стабильности/растворимости при высокой концентрации.

Различия наблюдались между двумя изотипами в зависимости от буферных условий. В PBS pH 7,4 10236gL6gH12 (IgG4P) показали большую растворимость, чем 10236gL6gH12 (IgG1); тогда как в 50 mM ацетата натрия, 125 mM хлорида натрия, pH 5, наблюдалось обратное. Растворимость 10236gL6gH12 (IgG4P) может быть улучшена за счет использования более типичного буфера для лекарственной формы, то есть 50 mM гистидина, 250 mM пролина, pH 5,5.

Таблица 13

| Описание антитела | PEG средняя точка (%) |  |  |
|-------------------|-----------------------|--|--|
|                   | PBS pH 7,4            | 50mM ацетат натрия,<br>125mM хлорид<br>натрия pH 5 | 50mM Гистидин,<br>250mM Пролин<br>pH 5,5 |

|       |              |      |      |           |
|-------|--------------|------|------|-----------|
| IgG4P | 10236gL6gH12 | 10,5 | 10,4 | 11,5      |
| IgG1  | 10236gL6gH12 | 9,9  | 11,3 | Не делали |

Оценка самовзаимодействия с использованием AC-SINS (спектроскопия самовзаимодействия наночастиц с аффинным захватом).

Анализ AC-SINS (Liu Y. MAbs. 2014 Mar-Apr;6(2):483-92) использовали для оценки разработки 10236gL6gH12 путем определения склонности к самовзаимодействию и, следовательно, получения информации о потенциальной стабильности агрегации. Это было выполнено в PBS pH 7,4.

Козье специфическое захватывающее антитело против Fc $\gamma$  человека (Jackson ImmunoResearch) заменяли буфером на 20 мМ ацетата натрия, pH 4,3, разбавляли до 0,4 мг/мл и добавляли 50 мкл к 450 мкл стабилизированных цитратом 20-нм золотых наночастиц (TedPella, США) и оставляли ночь при комнатной темп. Конъюгированные наночастицы блокировали 55 мкл ПЭГ-тиола в течение 1 часа, центрифугировали при 21000 x g в течение 6 минут, супернатант удаляли и ресуспендировали в 20 мМ ацетате натрия, pH 4,3, до конечного объема 150 мкл.

10236gL6gH12 (IgG4P и IgG1) разбавляли до 22 мкг/мл в PBS, pH 7,4 (200 мкл) и добавляли к равному объему неспецифического цельного IgG (Jackson ImmunoResearch), кратковременно встряхивали и добавляли 72 мкл в 96-луночный планшет. В каждую лунку добавляли по 8 мкл наночастиц (n=4). Поглощение считывали на планшет-ридере BMG в диапазоне 500-600 нм, аппроксимировали к кривыми Лоренца (RShiny) и PBS вычитали из образцов, чтобы получить  $\Delta\lambda_{max}$ . Данные обобщены в Таблице 14.

Оба изотипа 10236gL6gH12 как IgG4P, так и IgG1 показали низкие  $\lambda_{max}$  и  $\Delta\lambda_{max}$  (на фоне PBS), что свидетельствует о низкой склонности к самовзаимодействию и низком риске агрегации в PBS с pH 7,4.

Таблица 14

| Описание антитела |               | $\lambda_{max}$ | $\Delta\lambda_{max}$ |
|-------------------|---------------|-----------------|-----------------------|
| IgG4P             | 10236 gL6gH12 | 531,37          | 1,88                  |
| IgG1              | 10236 gL6gH12 | 530,27          | 1,17                  |

Исследование форсированной нагрузки для оценки склонности к дезамидированию Asn(94) (CDR3 легкой цепи)

Мотив дезамидирования Asn(94)Ser присутствует в CDR3 легкой цепи 10236gL6gH12. Склонность/скорость дезамидирования нельзя предсказать, поскольку она зависит от первичной последовательности и трехмерной структуры, а также от свойств раствора (R. C. Stephenson and S. Clarke (1989); K. Diepold et al (2012); Jasmin F. Sydow et al (2014); N.E. Robinson et al (2004). Поэтому было проведено исследование форсированной нагрузки для определения склонности 10236 gL6gH12 к дезамидированию по Asn(94). Это было выполнено только на 10236gL6gH12 (IgG4P); предполагалось, что скорость дезамидирования одинакова для IgG1, поскольку мотив дезамидирования присутствует в вариабельной области.

Также измеряли базальный уровень дезамидирования (ненагруженный образец);

низкие уровни указывают на низкую восприимчивость к дезамидированию, но они могут варьироваться в зависимости от различных производственных партий/условий.

Антитело 10236 gL6gH12 (IgG4P) было заменено буфером на условия (i), которые, как известно, способствуют дезамидированию остатков Asn(N) (Tris, pH 8,0/125 mM NaCl при 37°C), и (ii) контрольный буфер (ацетат, pH 5,0/125 mM). NaCl при 37°C). Конечная концентрация образца в каждом из буферов составляла 5,9 мг/мл при pH 8 и 6,6 мг/мл при pH 5, а затем разделяли на две аликвоты, одну из которых хранили при 4°C, а другую при 37°C до 2 недель. Аликвоту отбирали сразу (T0) и через 2 недели и хранили при -20°C.

Базальное дезамидирование получали путем анализа исходного образца, который хранился в PBS pH 7,4 при -20°C.

Все образцы размораживали и анализировали путем картирования пептидов с помощью масс-спектрометрии (МС) с использованием следующего метода:

Образцы подвергнутых стрессу белков восстанавливали с помощью TCEP и алкилировали хлоруксусной кислотой в Tris-HCL-буфере с pH 8, содержащем 0,1% вес./об. детергента Rapigest™. Добавляли смесь трипсин/LysC (1:50 масс./масс.) и образцы расщепляли в течение 1 часа при 37°C, затем добавляли химотрипсин (1:50 масс./масс.) и продолжали расщепление в течение ночи при комнатной температуре. Протеолиз останавливали добавлением муравьиной кислоты до 1% об./об. и образцы разбавляли до 0,5 мг/мл перед центрифугированием для удаления осажденного Rapigest™. Полученные пулы пептидов разделяли и анализировали на колонке Waters BEH C18, сопряженной с масс-спектрометром Thermo Fusion с положительным ионом, где применялся метод зависимой от данных орбитальной ловушки orbitrap-orbitrap с CID-фрагментацией. Данные ЖХ-МС анализировали с использованием программного обеспечения Thermo Xcalibur™ и Pepfinder™.

Базальный уровень дезамидирования в KLK5 10236 L-CDR3 составлял 0,7% по Asn94 (рассчитано с использованием Pepfinder™). Это увеличилось до максимума 10% для образца, инкубированного при 37°C в Tris pH 8 в течение 2 недель (Фигура 13).

Склонность к дезамидированию была низкой, и ее можно было контролировать, сводя к минимуму использование буферов с высоким pH во время производства, хранения и приготовления лекарственной формы.

Измерение аффинности полностью дезамидированного продукта: 10236 gL6-N94DgH12 (мутация NS в DS в CDR3 легкой цепи)

Легкая цепь 10236gL6gH12 была мутирована для замены Asn 94 на Asp (Asn94Asp) для создания суррогатной молекулы для полностью дезамидированного продукта 10236gL6gH12.

Кинетику связывания обоих антител 10236gL6gH12 и 10236gL6-N94DgH12 с KLK5 человека оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore T200, GE Life Sciences™) при 25°C для оценки воздействия 100% дезамидирования.

Специфическое козье антитело против Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с помощью химического связывания с амином

до уровня приблизительно 6000 RU. Каждый цикл анализа состоял из захвата молекул анти-KLK5 IgG на поверхности анти-Fc, введения ананта KLK5 (приготовленного на месте) в течение 300 с при скорости 30 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 600 с. В конце каждого цикла поверхность регенерировали со скоростью потока 10 мкл/мин, используя 60-секундную инъекцию 50 mM HCl, затем 30-секундную инъекцию 5 mM NaOH и последнюю 60-секундную инъекцию 50 mM HCl. KLK5 человека титровали от 20 нМ до 0,03 нМ (6 x 3-кратных серийных разведений) в рабочем буфере HBS-EP+ (GE Healthcare), дополненном до конечной концентрации 300 mM NaCl. Ввод пустой пробы буфера был включен, чтобы вычистить шум прибора и смещение показаний прибора. Кинетические параметры определяли с использованием модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (версия 3.0). Данные обобщены в Таблице 15.

Два повтора 10236gL6gH12 были включены для демонстрации экспериментальной воспроизводимости. Мутация Asn94Asp в CDR3 легкой цепи снижала аффинность к KLK5 в 4,5 раза.

Таким образом, интенсивное дезамидирование может повлиять на эффективность 10236gL6gH12, если условия производства, хранения и приготовления лекарственной формы не отслеживаются и не контролируются. Эксперимент с форсированной нагрузкой показал низкую склонность к дезамидированию остатка Asn94 и, следовательно, снизил риск молекулы.

Таблица 15.

| Описание антитела                  | ka (1/Мс) | kd (1/с) | KD (пМ)       |
|------------------------------------|-----------|----------|---------------|
| 10236gL6gH12 запуск 1 <sup>s</sup> | 2,26E+06  | 7,11E-04 | <b>314,3</b>  |
| 10236gL6gH12 запуск 2 <sup>s</sup> | 2,33E+06  | 6,58E-04 | <b>283,0</b>  |
| 10236gL6N94DgH12                   | 3,89E+06  | 4,86E-03 | <b>1249,2</b> |

<sup>s</sup> среднее значение для прогона 1 и прогона 2=299 пМ

Оценка вязкости при различных концентрациях для антитела 10236 gL6gH12 (hIgG4P)

Низкая вязкость при высокой концентрации антител важна для подкожного введения терапевтических молекул. Вязкость при возрастающих концентрациях антитела 10236 gL6gH12 в обычном буфере для приготовления лекарственной формы, 50 mM гистидина/250 mM пролина, pH 5,5, измеряли для изучения поведения вязкости.

Исследование проводили с помощью (i) начальной концентрации образцов и (ii) измерения вязкости, как подробно описано ниже.

#### (i) Концентрация

В общей сложности 23 мл антитела 10236 gL6gH12 (hIgG4P) концентрировали с использованием центрифужного фильтра Vivaspin® 20 MWCO 30кДа (Z14637, Sigma-Aldrich) при 4000 x g при 20°C для концентрирования антитела до тех пор, пока объем ретентата не составил примерно 950 мкл. Раствор ретентата извлекали и определяли конечную концентрацию антитела 10236 gL6gH12 (hIgG4P) с использованием измерения УФ-поглощения при 280 нм и коэффициента оптического поглощения 1,46 мл/(мг·см) с

использованием прибора NanoDrop™1000. Было определено, что концентрация концентрированного образца составляет 185 мг/мл (среднее значение для трех повторов), что дает 84% извлечения теоретической концентрации. Потери были в пределах ожидаемого диапазона для этого метода.

Затем образец антитела разбавляли, используя 50 мМ гистидина, 250 мМ пролина, pH 5,5, чтобы получить диапазон концентраций, подходящий для измерения вязкости. Концентрации разбавленных образцов были подтверждены измерениями УФ-поглощения при 280 нм и составили 159,8 мг/мл, 63,6 мг/мл и 33,2 мг/мл.

(ii) Измерение вязкости

Вязкость при каждой концентрации измеряли с использованием гибридного реометра Discovery Hybrid Rheometer-1 (DHR-1, TA Instruments) с пластиной Пельтье и системой жидкостного охлаждения для контроля температуры и с параллельной пластиной из нержавеющей стали 20-мм для измерения. Образец (80 мкл) в различных концентрациях (33,2 мг/мл, 63,6 мг/мл и 159,8 мг/мл) помещали в центр пластины Пельтье и измеряли вязкость (в мПа·с или сП) с помощью процедуры стационарного измерения потока при температуре 20°C с различными скоростями сдвига от 2,87918 до 287,918 с<sup>-1</sup>. Измеренную вязкость усредняли, когда значения в каждой точке скорости сдвига были постоянными (стандартное отклонение ±5%). Вязкость 10236 gL6gH12 (IgG4P) при различных концентрациях представлена в Таблице 16.

Тенденция к увеличению наблюдалась для антитела 10236 gL6gH12 (hIgG4P) между концентрацией и коэффициентом вязкости. Вязкость увеличивалась от 2,8 до 6,4 сП в диапазоне концентраций от 33,2 мг/мл до 159,8 мг/мл. Все эти образцы показали постоянный коэффициент вязкости (изменчивость менее 5%) при различных скоростях сдвига. Исследование показало, что антитело 10236 gL6gH12 (hIgG4P) проявляло низкую вязкость при высокой концентрации (~150 мг/мл) в смеси 50 мМ гистидина/250 мМ пролина, pH 5,5, и поэтому можно предположить, что оно подходит для подкожного введения.

Таблица 16.

| Концентрация (мг/мл) | Средняя вязкость (сП) | SD (сП) | %RSD |
|----------------------|-----------------------|---------|------|
| 33,2                 | 2,8                   | 0,08    | 2,99 |
| 63,6                 | 3,6                   | 0,08    | 2,29 |
| 159,8                | 6,4                   | 0,16    | 2,54 |

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

2. Антитело по п. 1, где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

3. Антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 и His147 применительно к SEQ ID NO: 51.

4. Антитело по п. 3, где эпитоп охарактеризован с помощью рентгеноструктурного анализа.

5. Антитело по любому из пп. 1-4, где антитело ингибирует или снижает протеазную активность KLK5.

6. Антитело по любому из пп. 1-5, где антитело связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI.

7. Антитело по любому из пп. 1-6, где антитело не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5.

8. Антитело по любому из пп. 1-7, где антитело образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI.

9. Антитело по любому из пп. 6-8, где фрагмент LEKTI представляет собой домен 5 LEKTI человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 54, или домен 8 LEKTI, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 61.

10. Антитело по любому из предыдущих пп., где антитело связывается с KLK5 человека, предпочтительно с KLK5 человека, содержащим SEQ ID NO: 53, и с KLK5 яванского макака, предпочтительно с KLK5 яванского макака, содержащим SEQ ID NO: 60.

11. Антитело по любому из предыдущих пп., где антитело не связывается калликреином 2 человека или яванского макака (KLK2); или калликреином 4 человека или яванского макака (KLK4); или калликреином 7 человека или яванского макака (KLK7).

12. Антитело по любому из пп. 3-11, где антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO:

1, или SEQ ID NO: 62, или SEQ ID NO: 63, предпочтительно CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 6.

13. Антитело по любому из предыдущих пп., где антитело представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

14. Антитело по любому из предыдущих пп., где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

15. Антитело по п. 14, где полноразмерное антитело выбирают из IgG1, IgG4 или IgG4P.

16. Антитело по любому из пп. 1-13, где антитело выбирают из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dAb или VHH.

17. Антитело по любому из пп. 1-16, где антитело содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, или 11, или 15, или 19, или 23; и/или

b. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, или 27, или 31, или 35, или 39, или 43.

18. Антитело по любому из пп. 1-15 или 17, где антитело содержит:

a. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25; и

b. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45.

19. Антитело по пп. 17 или 18, где аминокислотный остаток глутамина (Gln; Q) в L-CDR1 в положении 24 применительно к SEQ ID NO: 15 или 17 заменен аргинином (Arg; R) или лизином (Lys; K).

20. Антитело по любому из предыдущих пп., где KLK5 представляет собой KLK5 человека, содержащий SEQ ID NO: 51, или 52, или 53, или KLK5 яванского макака, содержащий SEQ ID NO: 60.

21. Антитело, которое:

a. конкурирует за связывание KLK5 с антителом по любому из пп. 1-20; и/или

b. перекрестно блокирует или перекрестно блокируется антителом по любому из пп. 1-20 для связывания KLK5; и/или

c. связывается с KLK5 с тем же эпитопом, что и антитело по любому из пп. 1-20; и/или

d. содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 29, или 33, или 37, или 41, или 45; и/или

e. содержит переменную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, или 25.

22. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп. 1-20.

23. Выделенный полинуклеотид по п. 22, где полинуклеотид кодирует:

a. переменную область легкой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидам 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или

ii. содержит SEQ ID NO: 8 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотиды 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 8 (или нуклеотидов 1-330 из SEQ ID NO: 8), или 12 (или нуклеотидов 1-330 из SEQ ID NO: 12), или 16, или 20, или 24, или 64, или 66; или

b. вариабельную область тяжелой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или

ii. содержит SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 10, или 28, или 32, или 36, или 40, или 44; или

c. легкую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

ii. содержит SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 14, или 18, или 22, или 26, или 65, или 67, или 100, или 101, или 102, или 103, или 104; или

d. тяжелую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или

ii. содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46.

24. Клонированный или экспрессируемый вектор, содержащий один или более полинуклеотидов по любому из пп. 22 или 23.

25. Клетка-хозяин, содержащая:

a. один или более полинуклеотидов по любому из пп. 22 или 23 или

b. один или более экспрессируемых векторов по п. 24.

26. Способ получения антитела по любому из пп. 1-20, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 25 в условиях, подходящих для получения антитела, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-20 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-20 или фармацевтическая композиция по п. 27 для применения в терапии.

29. Антитело по любому из пп. 1-20 или фармацевтическая композиция по п. 27 для

применения при лечении заболевания, характеризующегося нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

30. Антитело для применения по п. 29, где заболевание выбирают из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, или их комбинации.

31. Антитело для применения по п. 30, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

32. Антитело для применения по п. 30, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

33. Способ лечения заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5 у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-20 или фармацевтической композиции по п. 27.

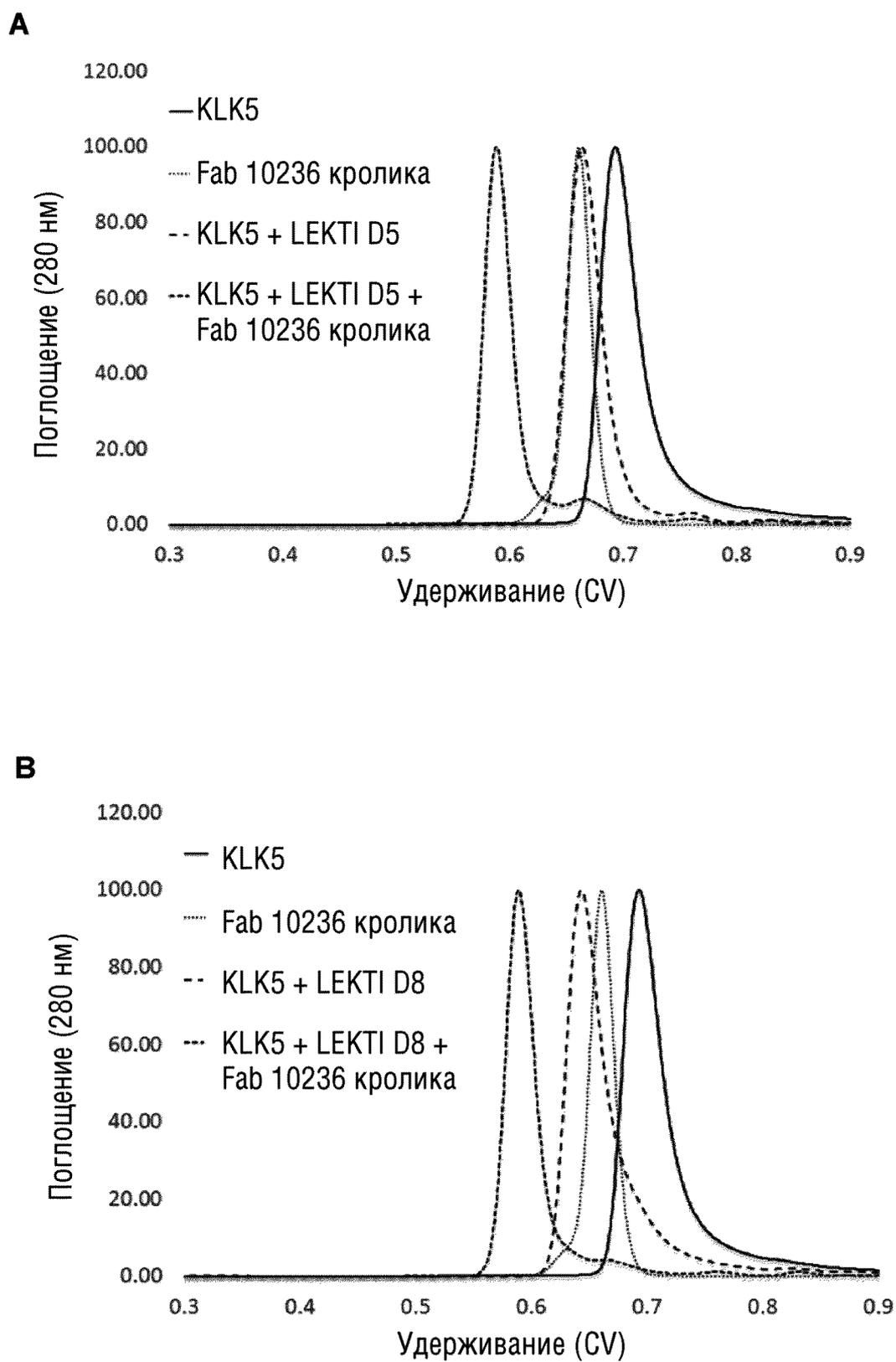
34. Способ по п. 33, где заболевание выбирают из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря.

35. Антитело для применения по п. 34, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

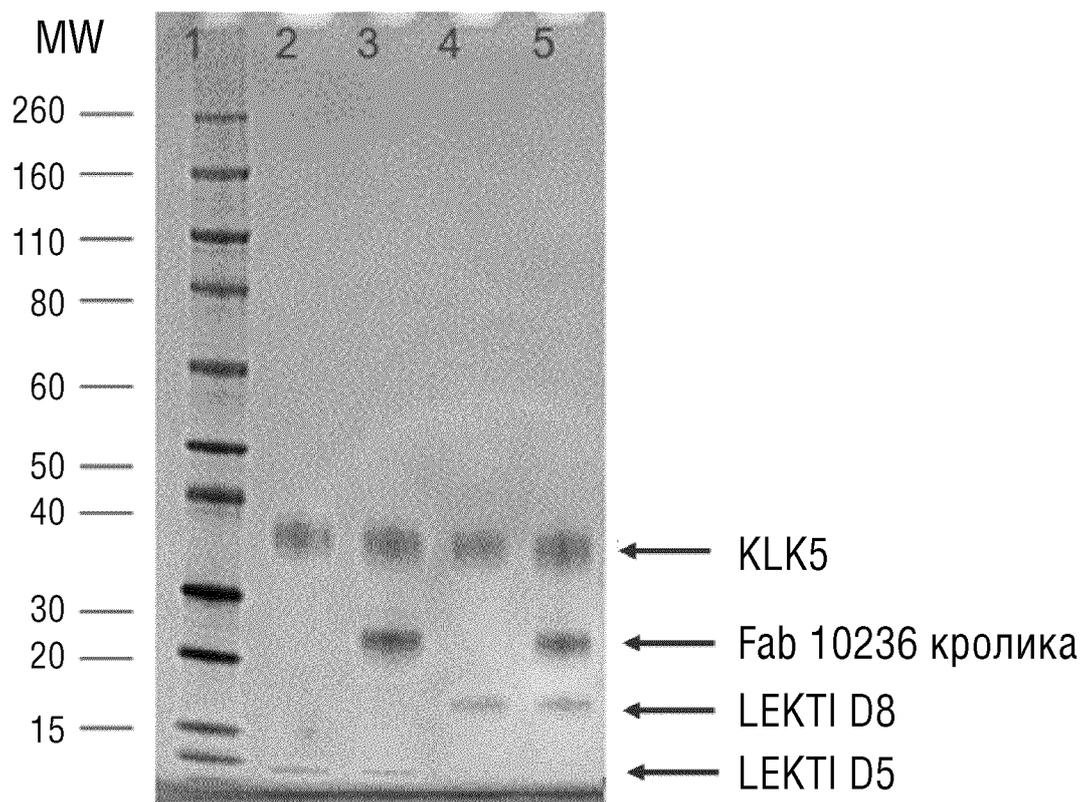
36. Антитело для применения по п. 34, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

По доверенности

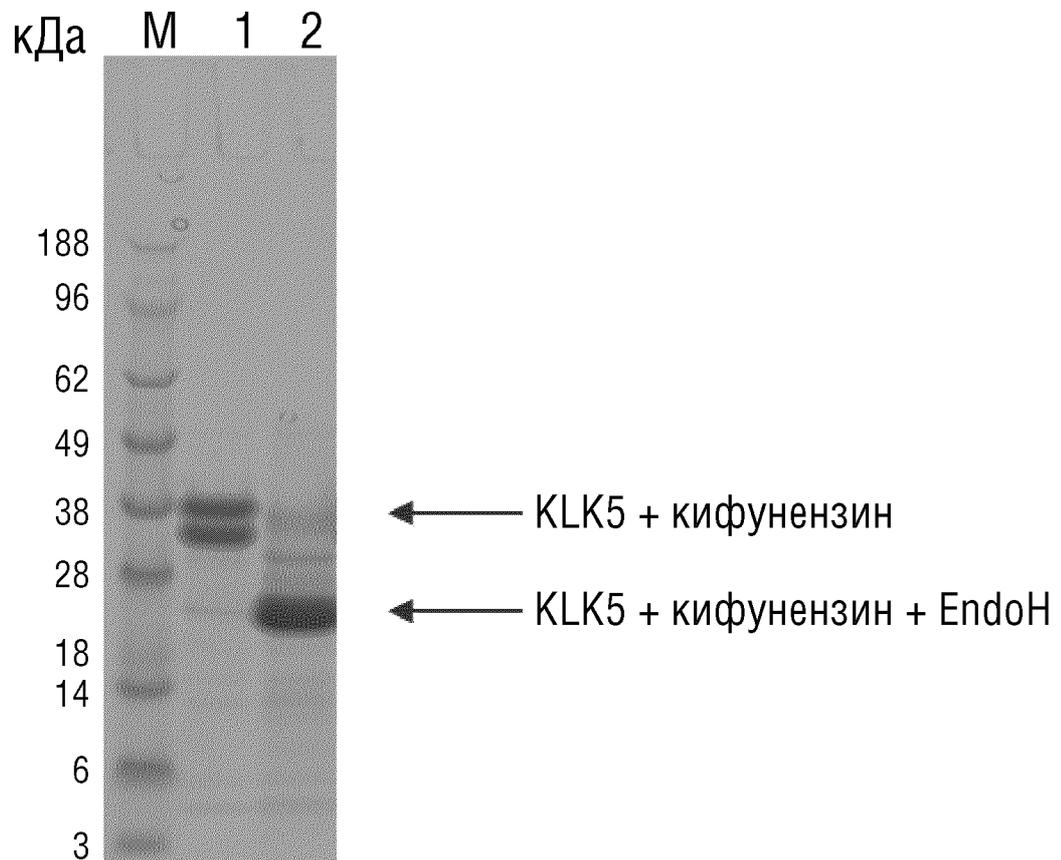
ФИГ.1



ФИГ.2

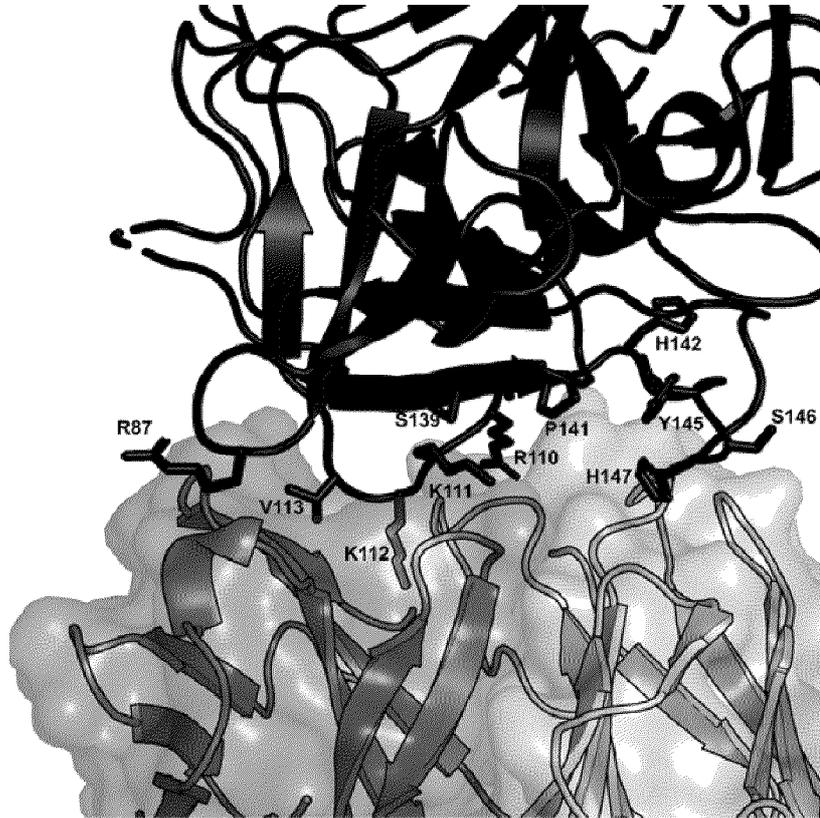


ФИГ.3

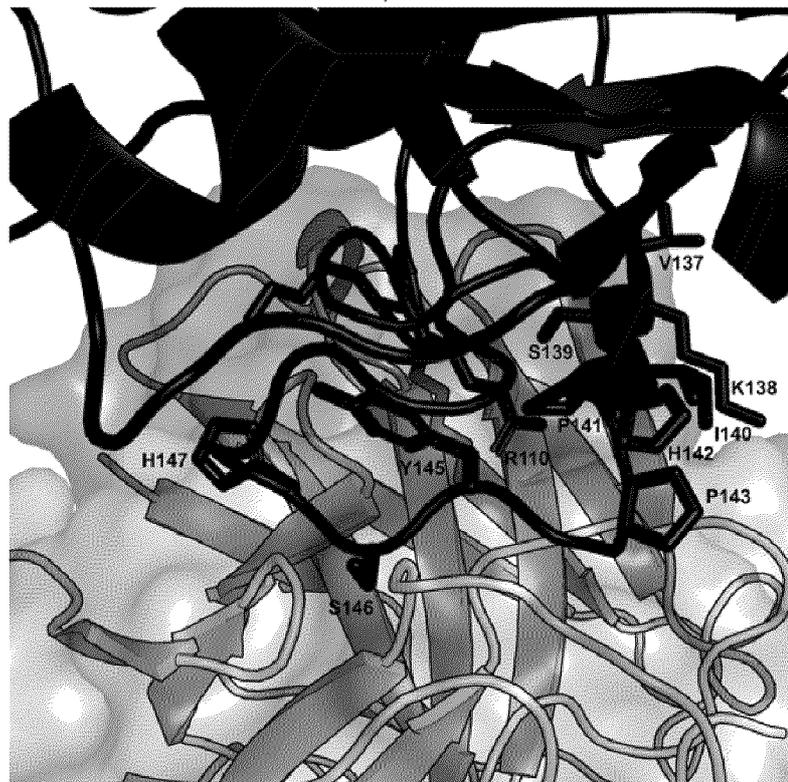


ΦΙΓ.4

A

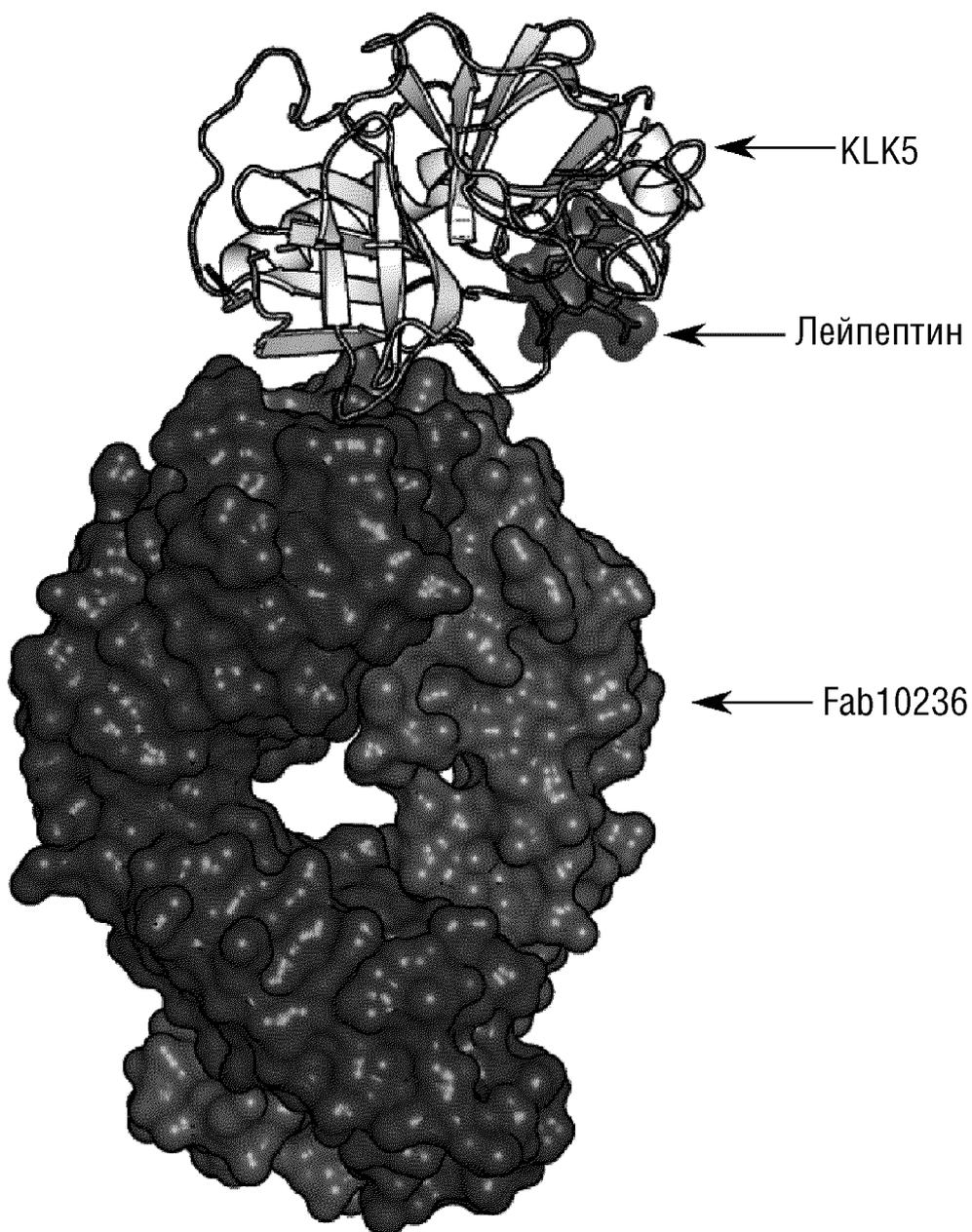


90°



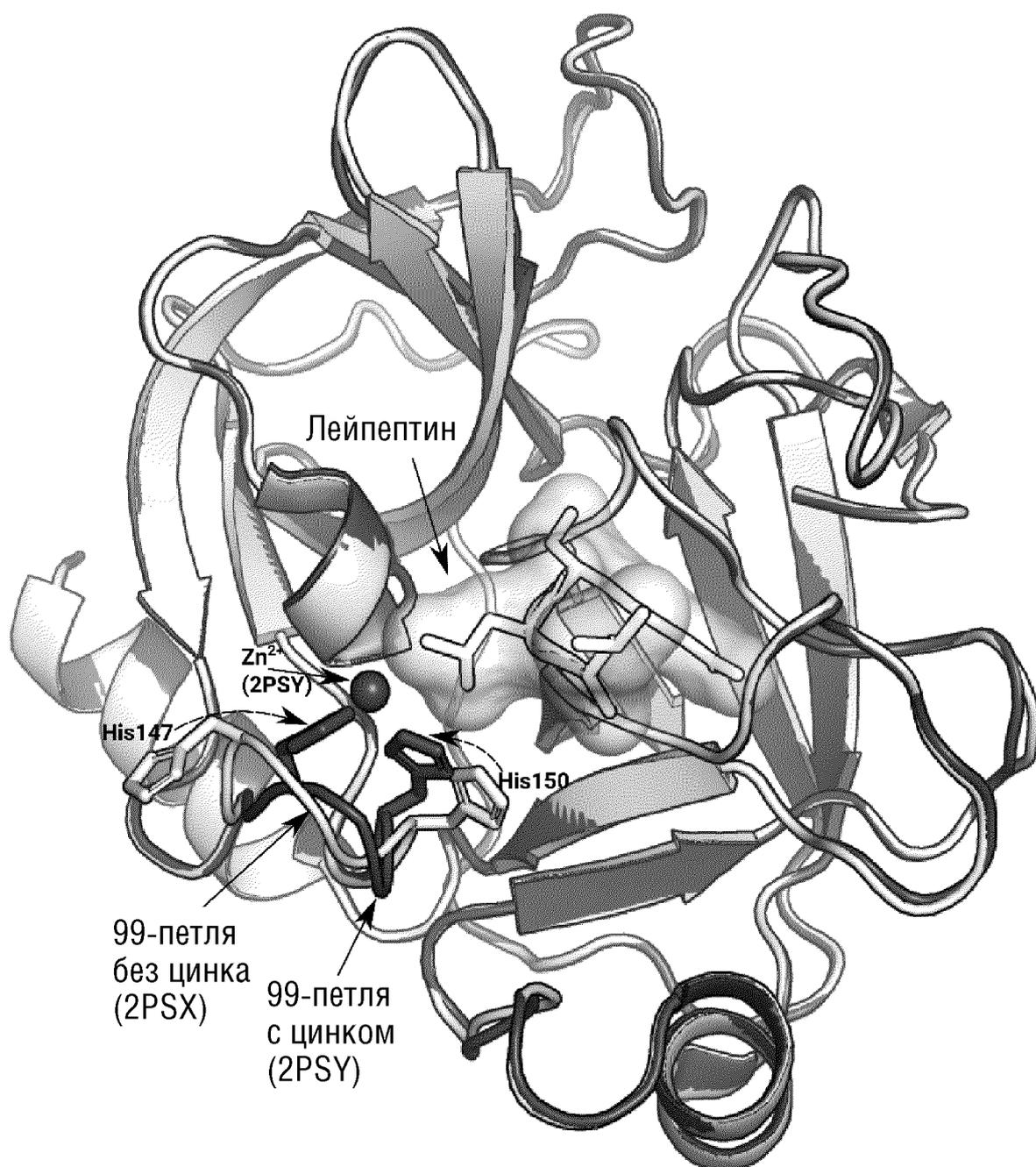
ФИГ.4 (продолжение)

В



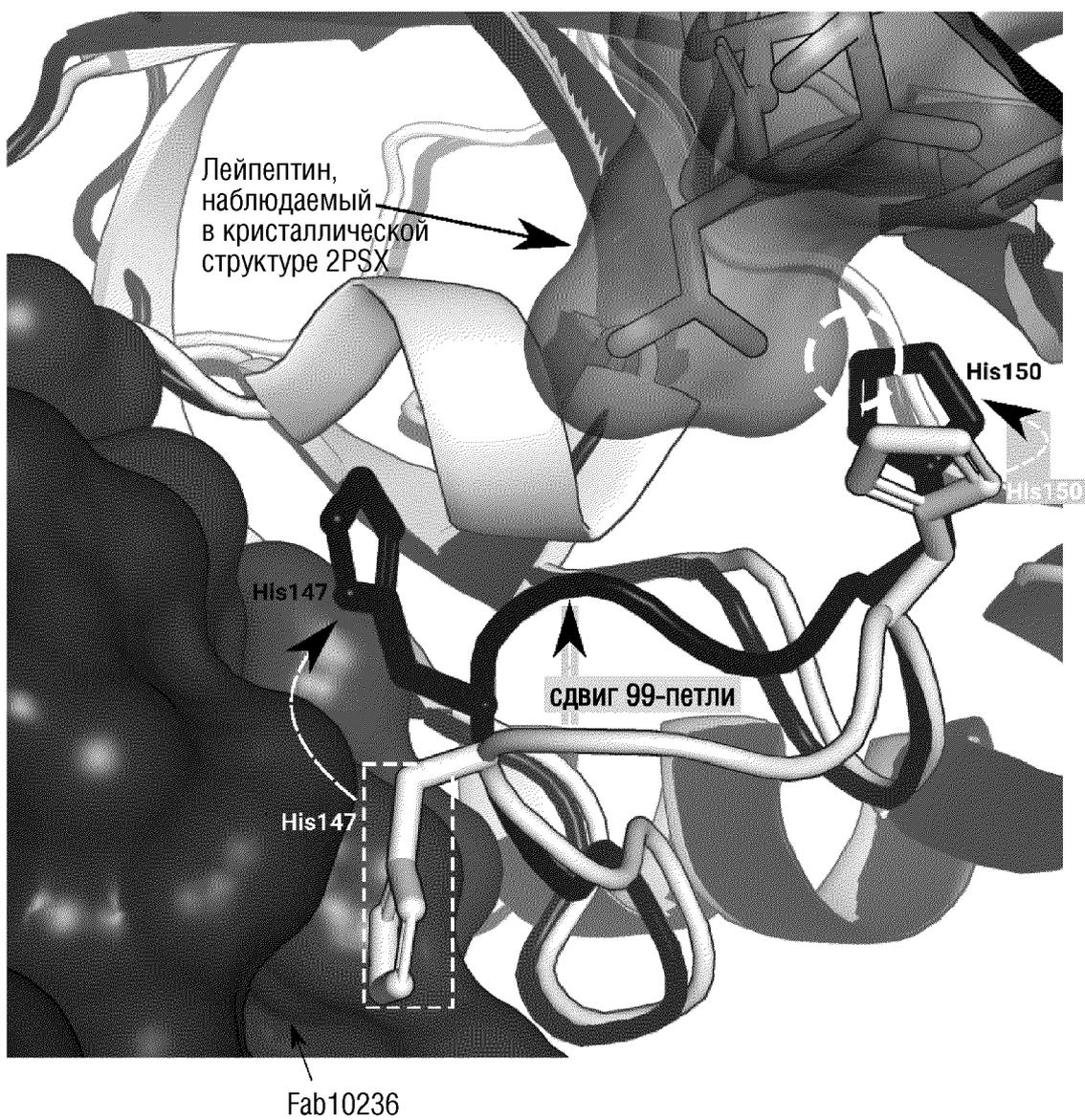
## ФИГ.4 (продолжение)

с

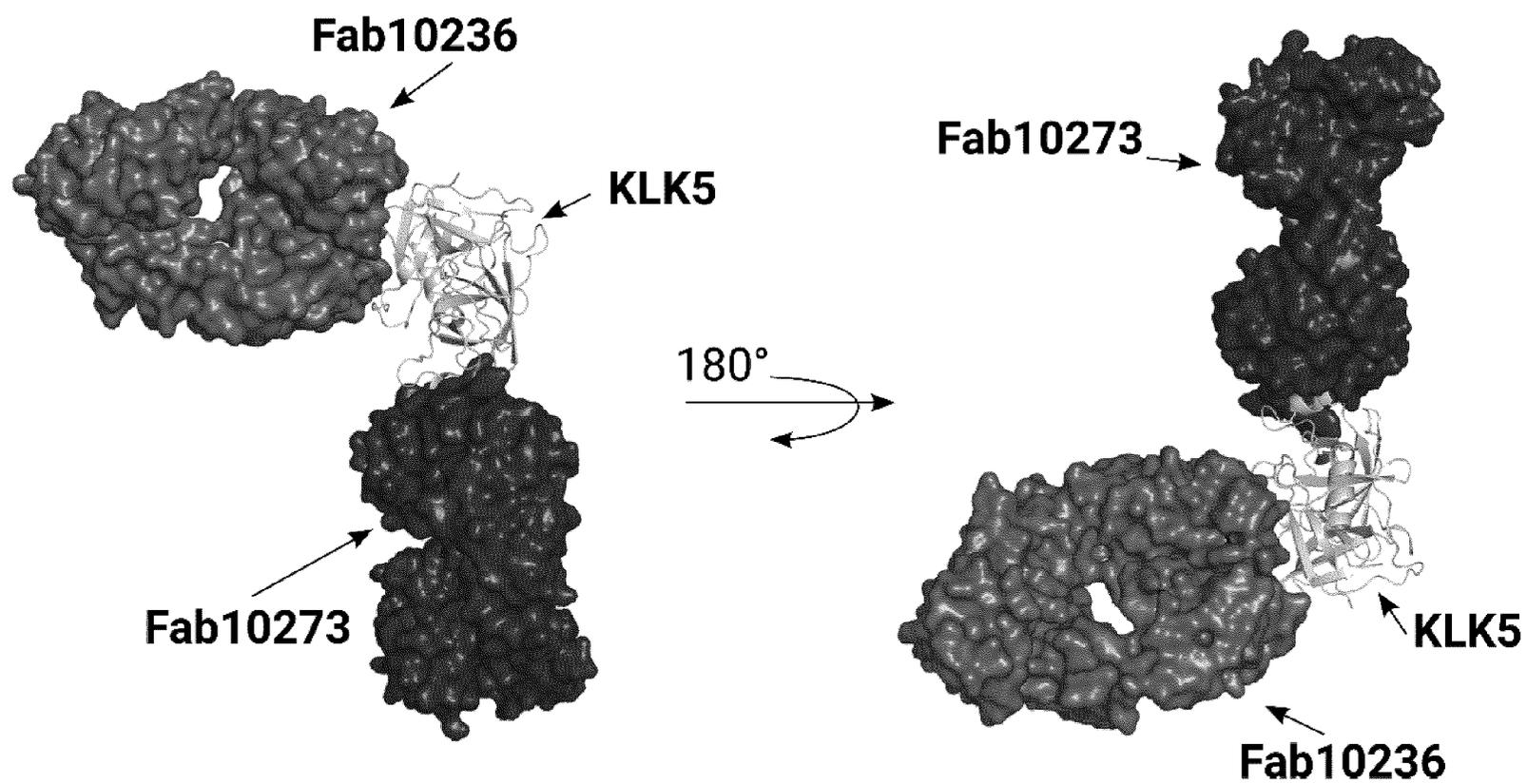


ФИГ.4 (продолжение)

D



Фиг.5



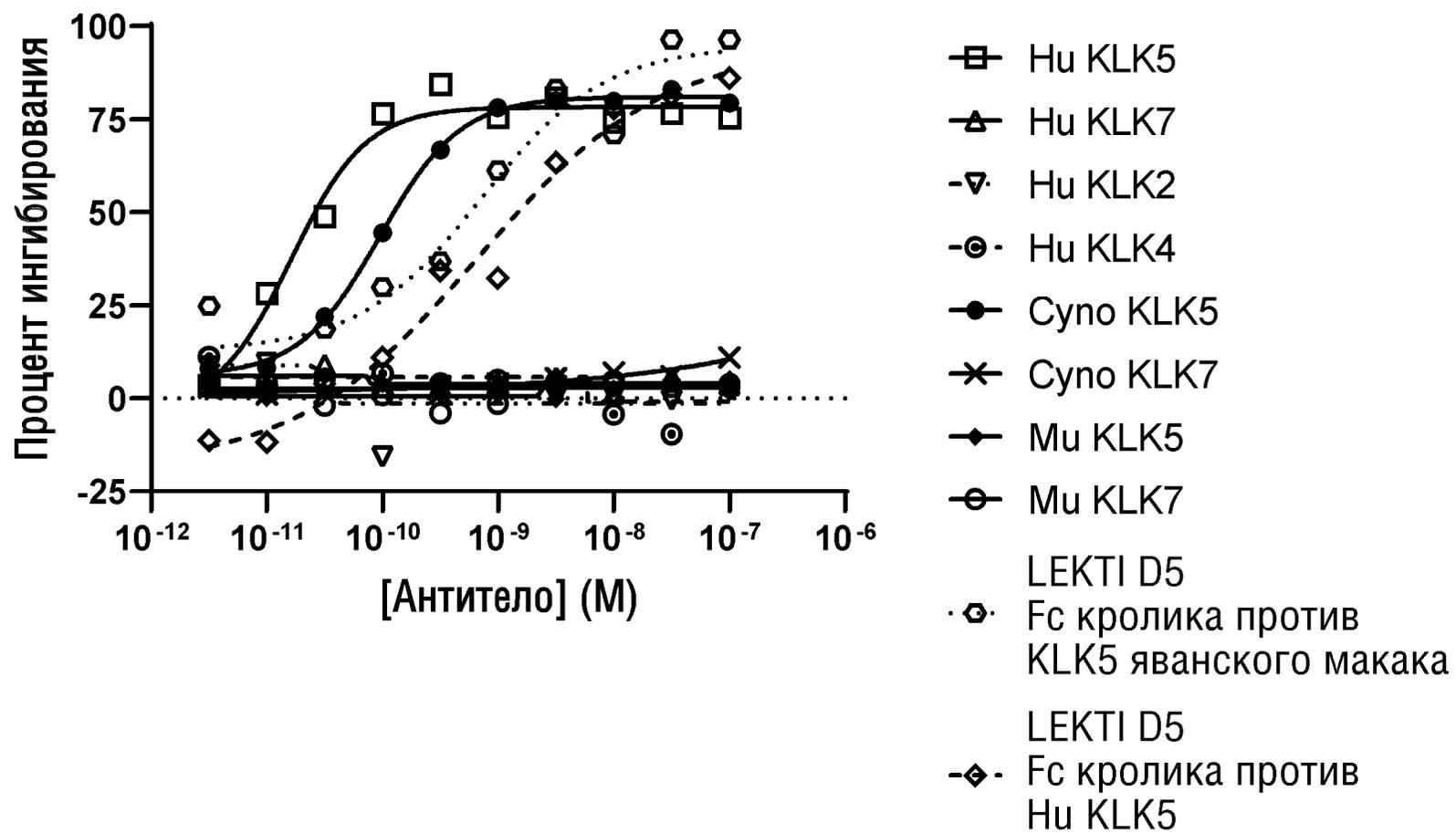
# ФИГ.6

|                   | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110                |              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                |                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |               |                |                |            |              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|--------------------|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----------------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------|----------------|----------------|------------|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Легкая цепь 10236 | A | Y | D  | M  | T  | Q  | T  | P  | A  | S  | V  | E  | V  | A  | V  | G  | G  | T  | V  | T  | I   | K   | <u>QASQSISSWLA</u> | W            | Y | Q | Q | K | P | G | Q | P | P | K | L | L | I | Y | <u>LASTLAS</u> | G              | V | S | R | F | K | G | S | G | S | G | T | Q | F | T | L | T | I | S | G | V | E | C | A | D | A | A | T | Y | Y | <u>QOQYTN</u> | <u>SNIIINT</u> | F              | G          | G            | T | E | V | V | K |   |   |   |   |
| IGKV1-6           | A | I | Q  | M  | T  | Q  | S  | P  | S  | S  | L  | S  | A  | S  | V  | G  | D  | R  | V  | T  | I   | T   | <u>RASQGI</u>      | <u>RNDLG</u> | W | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y              | <u>AASSLQS</u> | G | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y             | Y              | <u>LQDY</u>    | <u>---</u> | <u>NYPLT</u> | F | G | G | T | K | V | E | I | K |
| 10236gL5          | A | Y | D  | M  | T  | Q  | S  | P  | S  | S  | L  | S  | A  | S  | V  | G  | D  | R  | V  | T  | I   | T   | <u>QASQSISSWLA</u> | W            | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y | <u>LASTLAS</u> | G              | V | P | S | R | F | K | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y             | <u>QOQYTN</u>  | <u>SNIIINT</u> | F          | G            | G | T | K | V | E | I | K |   |   |
| 10236gL6          | A | Y | D  | M  | T  | Q  | S  | P  | S  | S  | L  | S  | A  | S  | V  | G  | D  | R  | V  | T  | I   | T   | <u>QASQSISSWLA</u> | W            | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y | <u>LASTLAS</u> | G              | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y             | <u>QOQYTN</u>  | <u>SNIIINT</u> | F          | G            | G | T | K | V | E | I | K |   |   |
| 10236gL6 (Q24R)   | A | Y | D  | M  | T  | Q  | S  | P  | S  | S  | L  | S  | A  | S  | V  | G  | D  | R  | V  | T  | I   | T   | <u>RASQSISSWLA</u> | W            | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y | <u>LASTLAS</u> | G              | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y             | <u>QOQYTN</u>  | <u>SNIIINT</u> | F          | G            | G | T | K | V | E | I | K |   |   |
| 10236gL6 (Q24K)   | A | Y | D  | M  | T  | Q  | S  | P  | S  | S  | L  | S  | A  | S  | V  | G  | D  | R  | V  | T  | I   | T   | <u>KASQSISSWLA</u> | W            | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y | <u>LASTLAS</u> | G              | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y             | <u>QOQYTN</u>  | <u>SNIIINT</u> | F          | G            | G | T | K | V | E | I | K |   |   |
| 10236gL7          | A | I | Q  | M  | T  | Q  | S  | P  | S  | S  | L  | S  | A  | S  | V  | G  | D  | R  | V  | T  | I   | T   | <u>QASQSISSWLA</u> | W            | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y | <u>LASTLAS</u> | G              | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y             | <u>QOQYTN</u>  | <u>SNIIINT</u> | F          | G            | G | T | K | V | E | I | K |   |   |
| 10236gL8          | A | Y | Q  | M  | T  | Q  | S  | P  | S  | S  | L  | S  | A  | S  | V  | G  | D  | R  | V  | T  | I   | T   | <u>QASQSISSWLA</u> | W            | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y | <u>LASTLAS</u> | G              | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y             | <u>QOQYTN</u>  | <u>SNIIINT</u> | F          | G            | G | T | K | V | E | I | K |   |   |

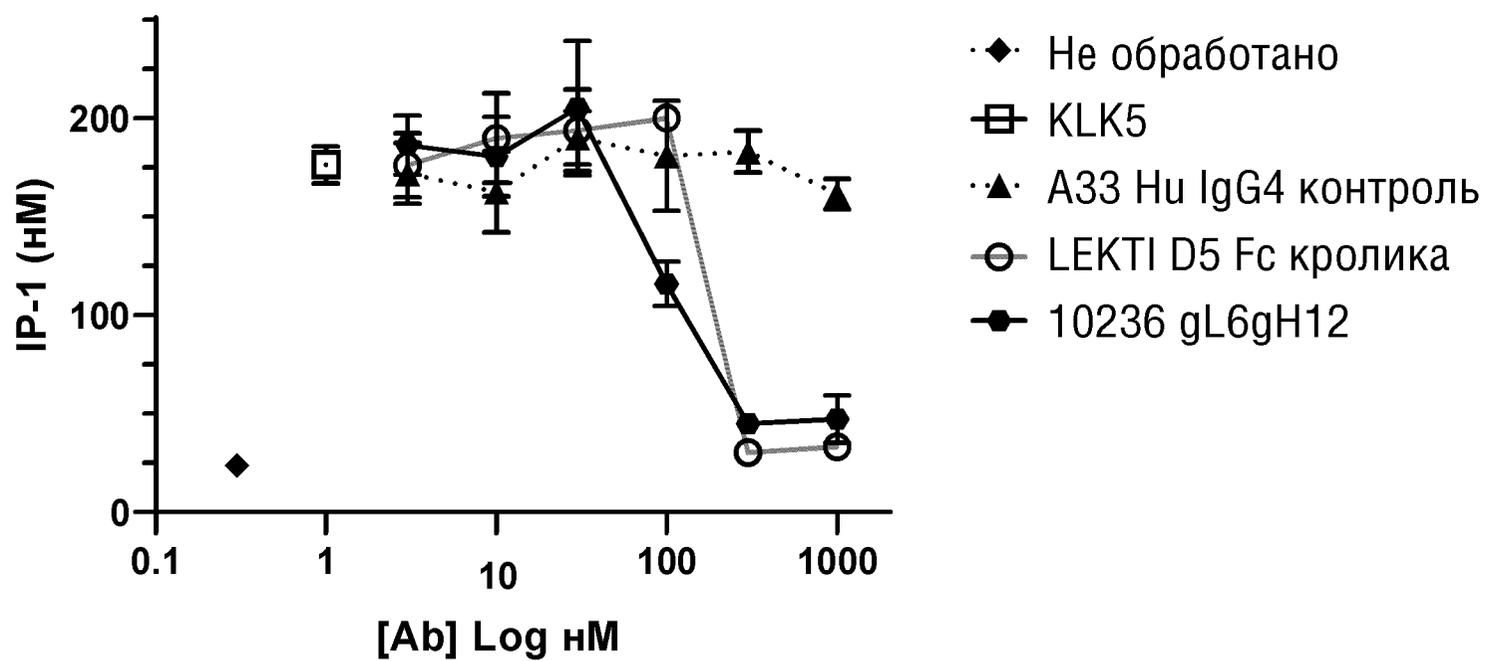
# ФИГ.7

|                    |   |   |    |    |    |    |                    |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
|--------------------|---|---|----|----|----|----|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|-------------------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|---|
|                    | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30                 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70                      | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 |   |
| Тяжелая цепь 10236 | - | Q | S  | V  | E  | E  | S                  | G  | G  | R  | L  | V  | T  | P  | G                       | T  | P  | L  | T  | L  | T   | C   | T   | V   | S |
|                    |   |   |    |    |    |    | <u>GFPLSNYA-MS</u> |    |    |    |    |    |    |    | <u>DIYPSDIIDYASWAKG</u> |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
|                    |   |   |    |    |    |    |                    |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
| IGHV4-4            | Q | V | L  | Q  | E  | S  | G                  | P  | L  | V  | K  | P  | S  | G  | T                       | L  | S  | L  | T  | C  | A   | V   | S   |     |   |
|                    |   |   |    |    |    |    | <u>GGSISSSNWS</u>  |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
|                    |   |   |    |    |    |    |                    |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
| 10236gH9           | E | V | Q  | L  | Q  | E  | S                  | G  | P  | L  | V  | K  | P  | S  | G                       | T  | L  | S  | L  | T  | C   | A   | V   | S   |   |
|                    |   |   |    |    |    |    | <u>GFPLSNYA-MS</u> |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
| 10236gH10          | E | V | Q  | L  | Q  | E  | S                  | G  | P  | L  | V  | K  | P  | S  | G                       | T  | L  | S  | L  | T  | C   | A   | V   | S   |   |
|                    |   |   |    |    |    |    | <u>GFPLSNYA-MS</u> |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
| 10236gH11          | E | V | Q  | L  | Q  | E  | S                  | G  | P  | L  | V  | K  | P  | S  | G                       | T  | L  | S  | L  | T  | C   | A   | V   | S   |   |
|                    |   |   |    |    |    |    | <u>GFPLSNYA-MS</u> |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
| 10236gH12          | E | V | Q  | L  | Q  | E  | S                  | G  | P  | L  | V  | K  | P  | S  | G                       | T  | L  | S  | L  | T  | C   | A   | V   | S   |   |
|                    |   |   |    |    |    |    | <u>GFPLSNYA-MS</u> |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |
| 10236gH14          | E | V | Q  | L  | Q  | E  | S                  | G  | P  | L  | V  | K  | P  | S  | G                       | T  | L  | S  | L  | T  | C   | A   | V   | S   |   |
|                    |   |   |    |    |    |    | <u>GFPLSNYA-MS</u> |    |    |    |    |    |    |    |                         |    |    |    |    |    |     |     |     |     |   |

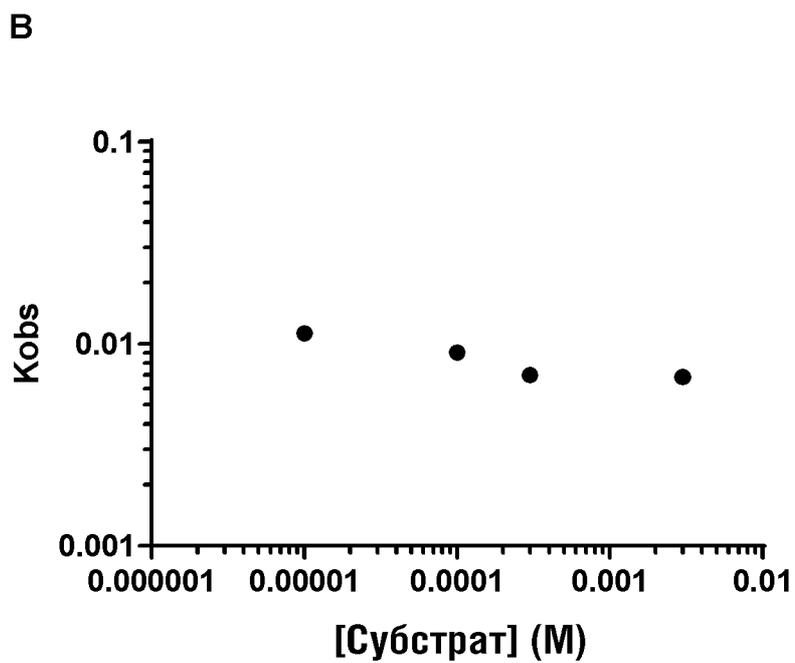
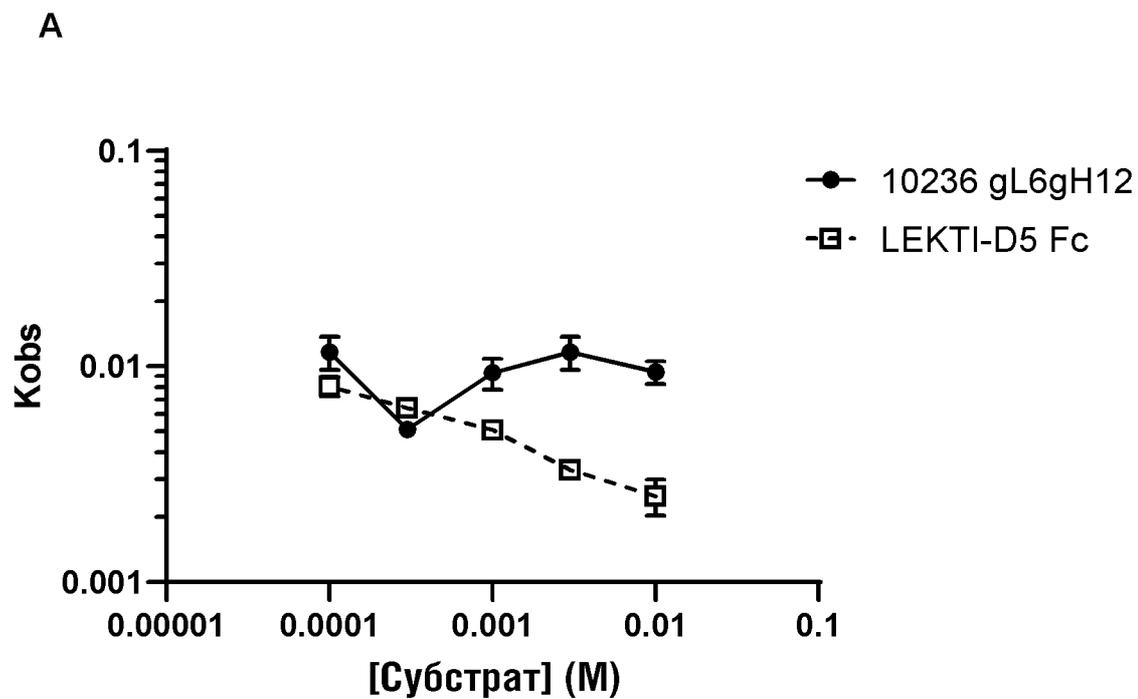
ФИГ.8



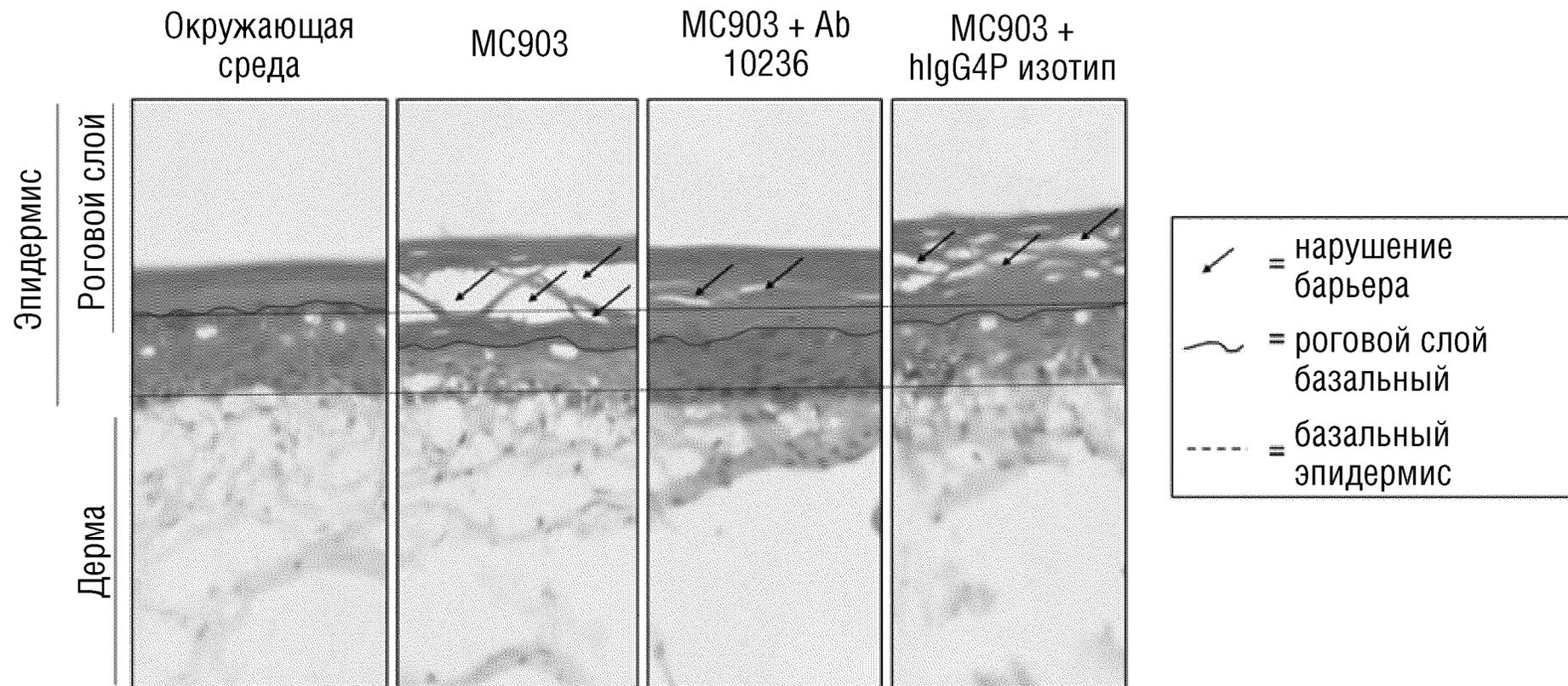
ФИГ.9



ФИГ.10

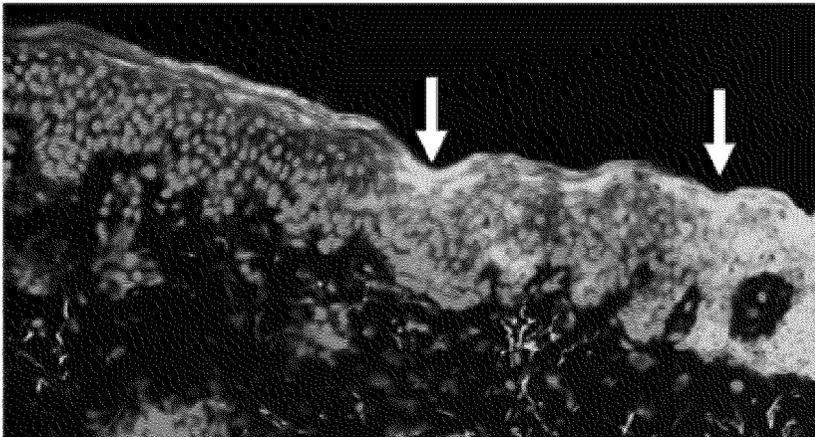


ФИГ.11

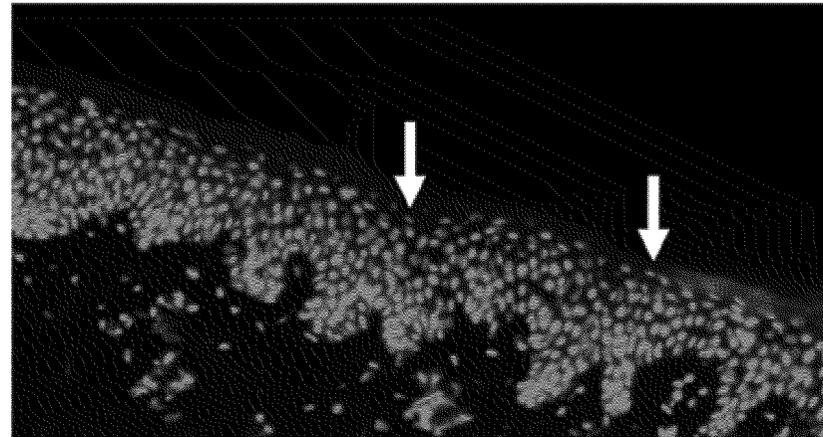


# ФИГ.12

А) Срез кожи с атопическим дерматитом + контрольный буфер



В) Срез кожи с атопическим дерматитом + Ab 10326



ФИГ.13

Дезамидирование в пептиде TNSNIINTE (N94)  
LC-CDR3 10236gL6gH12

