

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292246 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.18

(22) Дата подачи заявки
2021.02.01

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

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ KLK5

(31) 2001447.8; 2008022.2

(32) 2020.02.03; 2020.05.28

(33) GB

(86) PCT/EP2021/052249

(87) WO 2021/156171 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) 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 против KLK5 и к их применению при лечении болезни Нетертона, атопического дерматита и онкологического заболевания.

202292246

A1

A1

202292246

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574892RU/042

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 кодирующих протеазы генов (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 KLK5. KLK5 обладает трипсиноподобной активностью. В своей пре-проформе он содержит сигнальный пептид из 29 аминокислот, за которым следует активационный пептид из 37 аминокислот. Активная зрелая форма состоит из 237 аминокислот, содержащих зрелый фермент, который включает домен сериновой протеазы, ответственный за протеазную активность (Michael I. P et al., 2005; JBC 280:15, 14628-35).

Хотя KLK5 обнаружен во многих тканях, он, по-видимому, 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 (LEKTI), который кодируется геном SPINK5 (Chavans P et al., 2005; Nat Genet 37, 56-65). LEKTI 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 LEKTI 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 атопическому дерматиту. Активность KLK5 в отношении KLK7 также способствует нарушению кожного барьера, что приводит к проникновению аллергенов и микробов и продуцированию IL-1β.

Мыши SPINK5^{-/-} повторяют фенотип, очень напоминающий синдром Нетертона, воспроизводящий кожные и воспалительные аспекты заболевания (Yant T et al.; 2004, Genes Dev 18 2354-58). SPINK5^{-/-}-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^{-/-}, так и у KLK5^{-/-} 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 атопическим дерматитом (AD) и полиморфизмом LEKTI с выраженными аномальными вариантами LEKTI (Hovnanian A. 2013; Cell Tissue Res 351 289-300).

К настоящему времени, не существует KLK5-специфических терапий, хотя ингибитор KLK7 находится в клинической разработке. Проводились другие 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: Моноклональное антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), 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 7, или 8, или 9, 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29.

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

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 10 или 14, или 23.

Вариант осуществления 3: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, где:

a. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 23.

Вариант осуществления 4: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

Вариант осуществления 5: Антитело по любому из предыдущих пп., где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

Вариант осуществления 6: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 5, где полноразмерное антитело выбирают из IgG1, IgG4 или IgG4P.

Вариант осуществления 7: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-4, где антитело выбирают из Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dAb или VHH.

Вариант осуществления 8: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, где антитело содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и/или

b. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32 или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32 или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134.

Вариант осуществления 9: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где антитело содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и/или

b. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110.

Вариант осуществления 10: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, или 8, или 9, где антитело содержит:

а. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 36 или 40, или 44, или 48; и

б. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 52 или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52 или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

Вариант осуществления 11: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где антитело содержит:

а. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40; и

б. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

Вариант осуществления 12: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где KLK5 представляет собой KLK5 человека, содержащий SEQ ID NO: 142, или 143, или 144, или KLK5 яванского макака, содержащий SEQ ID NO: 151.

Вариант осуществления 13: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим по меньшей мере один, предпочтительно, по меньшей мере два или более аминокислотных остатков из группы, состоящей из Leu212, Ser213, Gln214, Lys215, Arg216, Glu218, Asp219, Ala220, Pro222, Gly233, Pro269, Asn270 и Pro272 применительно к SEQ ID NO: 142.

Вариант осуществления 14: Антитело в соответствии с вариантом осуществления, 13, где эпитоп охарактеризован с помощью рентгеноструктурного анализа.

Вариант осуществления 15: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-14, где антитело

а. ингибирует или снижает протеазную активность KLK5; и/или

б. связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI; и/или

с. не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5; и/или

д. образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI;

Вариант осуществления 16: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 15, где фрагмент LEKTI представляет собой домен 5 LEKTI человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 145, или домен 8 LEKTI, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 152.

Вариант осуществления 17: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело связывается с KLK5 человека, предпочтительно с KLK5 человека, содержащим SEQ ID NO: 144, и с KLK5 яванского макака, предпочтительно с KLK5 яванского макака, содержащим SEQ ID NO: 151.

Вариант осуществления 18: Антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, 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).

Вариант осуществления 19: Антитело, которое конкурирует за связывание KLK5 с антителом по любому из пп.1-18; и

а. перекрестно блокирует или перекрестно блокируется антителом по любому из пп. 1-18 для связывания KLK5; или

б. связывается с KLK5 с тем же эпитопом, что и антитело по любому из пп.1-18; и где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 38; и/или содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 110.

Вариант осуществления 20: Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18.

Вариант осуществления 21: Выделенный полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 20, где полинуклеотид кодирует:

а. вариабельную область легкой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 31, или 35, или 39, или 43, или 47; или

ii. содержит SEQ ID NO:31 или 35, или 39, или 43, или 47; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 31 или 35, или 39, или 43, или 47; или

б. вариабельную область тяжелой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

ii. содержит SEQ ID NO:33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

iii. состоит по существу, из SEQ ID NO:33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

с. легкую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 37, или 41, или 45, или 49; или

ii. содержит SEQ ID NO:37 или 41, или 45, или 49; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 37, или 41, или 45, или 49; или

д. тяжелую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137; или

ii. содержит SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73,

или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137.

Вариант осуществления 22: Клонировующий или экспрессирующий вектор, содержащий один или более полинуклеотидов по любому из пп. 20 или 21.

Вариант осуществления 23: Клетка-хозяин, содержащая:

а. один или более полинуклеотидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 20 или 21 или

б. один или более экспрессирующих векторов в соответствии с вариантом осуществления 22.

Вариант осуществления 24: Способ получения антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с вариантом осуществления 23 в подходящих условиях для получения антитела и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

Вариант осуществления 25: Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-18 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей.

Вариант осуществления 26: Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18 или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 25 для применения в терапии.

Вариант осуществления 27: Антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18 или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 25 для применения при лечении заболевания, характеризующегося нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

Вариант осуществления 28: Антитело в соответствии с вариантом осуществления 27, 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 29: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 28, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

Вариант осуществления 30: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 28, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

Вариант осуществления 31: 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 1-18 или фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления 25.

Вариант осуществления 32: Способ в соответствии с вариантом осуществления 31, где заболевание выбирают из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря.

Вариант осуществления 33: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 32, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

Вариант осуществления 34: Антитело для применения в соответствии с вариантом осуществления 32, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Ингибирование высвобождения IP-1 из кератиноцитов, стимулированных KLK5, с помощью антитела 10273. Определяли количество IP-1, высвобождаемого в культуральную среду после стимуляции кератиноцитов KLK5 в присутствии или в отсутствие кроличьего антитела 10273. Антитело 10273 ингибировало высвобождение IP-1, тогда как контрольное изотипическое Ab не проявляло ингибирующего эффекта.

Фигура 2. Значения Kobs были нанесены на график в зависимости от концентрации субстрата для антитела 10273 и белка LEKTID5 Fc. Представленные данные относятся к 2нМ Ab 10273 и 2нМ LEKTID5 Fc. Наклоны показывают, что антитело 10273 является неконкурентным ингибитором, в то время как белок LEKTI является конкурентным ингибитором.

Фигура 3. Эксклюзионная хроматография. На панелях А и В показаны профили элюирования только KLK5 человека (сплошная линия), только кроличьего Fab-антитела 10273 (точечная линия), человеческого KLK5+LEKTI D5 (длинная пунктирная линия, панель А) или человеческого KLK5+LEKTID8 Fc (длинная пунктирная линия, панель В) и человеческого KLK5+LEKTI D5 Fc+кроличье Fab-антитело 10273 (короткая пунктирная линия, панель А) или человеческого KLK5+LEKTI D8Fc+кроличье Fab-антитело 10273 (короткая пунктирная линия, панель В).

Фигура 4. А: SDS-PAGE пиковых фракций из SEC, показанных на Фигуре 3А. Дорожка 1, маркеры MW, дорожки 2 и 3, фракции бинарного комплекса KLK5+LEKTID5, дорожки 4 и 5, пиковые фракции тройного комплекса KLK5+LEKTI D5+кроличье Fab-антитело 10273. В: SDS-PAGE пиковых фракций из SEC, показанных на Фигуре 3В. Дорожка 1, маркеры MW, дорожки 2 и 3, пиковые доли бинарного комплекса KLK5+LEKTID8, дорожки 4 и 5, пиковые фракции тройного комплекса KLK5+LEKTID8+кроличье Fab-антитело 10273.

Фигура 5. SDS-PAGE KLK5, полученный для рентгеноструктурных исследований. Дорожка М, маркеры MW. Дорожка 1, человеческий KLK5, очищенный из культур, выращенных в присутствии кифунензина (kif). Дорожка 2, KLK5 человека, очищенный от культур кифунензина и обработанный эндогликозидазой Н (Endo H).

Фигура 6. Схематическое изображение эпитопа KLK5 человека в комплексе с кроличьим Fab-антителом 10273. Тяжелые и легкие цепи Fab показаны на графическом изображении и темных и светлых поверхностях, соответственно, прозрачной поверхности. Остатки Leu212 (163), Ser213 (164), Gln214 (165), Lys215 (166), Arg216 (167), Glu218 (169), Asp219 (170), Ala220 (171), Pro222 (173), Gly233 (184), Pro269 (223), Asn270 (224) и Pro272 (226), которые образуют эпитоп на KLK5 человека, связанном антителом 10273,

изображены в виде черных палочек.

Фигура 7. Две ориентации кристаллической структуры KLK5 человека в комплексе с кроличьими Fab-антителами 10236 и 10273. KLK5 человека показан в виде ленты, кроличьи Fab-антитела 10236 и 10273 показаны сплошными поверхностями.

Фигура 8. Гуманизация последовательности вариабельной области легкой цепи кролика антитела 10273. Трансплантаты 10273gL2, 10273gL2 Q1R, 10273gL2 Q1K и 10273gL2 Q1H представляют собой гуманизированные трансплантаты кроличьей вариабельной области легкой цепи антитела 10273 с использованием зародышевой линии человека IGKV1D-13 в качестве акцепторного каркаса. CDR показаны жирным шрифтом/подчеркнуты. Мутации в CDRL1, которые приводят к увеличению общей pI, показаны жирным/подчеркнутым и выделены: Q1R, Q1K или Q1H.

Фигура 9. Гуманизация последовательности вариабельной области тяжелой цепи кролика антитела 10273. Трансплантаты 10273gH1, gH4, gH5, gH8, gH10 и gH11 представляют собой гуманизированные трансплантаты кроличьей вариабельной области тяжелой цепи антитела 10273 с использованием вариабельной области тяжелой цепи с использованием человеческой зародышевой линии IGHV3-66 в качестве акцепторного каркаса. CDR показаны жирным шрифтом/подчеркнуты. Донорные остатки выделены жирным шрифтом/курсивом и заштрихованы серым цветом: V24, I48, G49, K71, S73 и V78. Мутации в CDR-H3 для удаления потенциального сайта гидролиза DP (D116E) или для увеличения pI (D116N) показаны жирным шрифтом/подчеркнуты и выделены.

Фигура 10. Ингибирование человеческого KLK5 гуманизированными трансплантатами антитела 10273. Гуманизированные варианты трансплантата Ab 10273 анализировали для определения степени, в которой они ингибируют активность KLK5. Значения процента ингибирования рассчитывали и данные наносили на график, как описано в Примере 8. No Inh=нет ингибитора; No Sub=Нет субстрата; No Enz=Нет фермента.

Фигура 11. Влияние встряхивания на агрегационную стабильность гуманизированных трансплантатов антитела 10273 в двух буферах разного состава и pH.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание теперь будет описано применительно к конкретным неограничивающим аспектам и вариантам 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; б) ингибирование заболевания, т. е. прекращение его развития; и (с) облегчение заболевания, т. е. вызывание регрессии заболевания.

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

Термин «выделенный» означает во всем этом описании, что антитело, антигенсвязывающий фрагмент 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 7, или 8, 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29.

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 непротессированному 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: 144 (активный KLK5 человека). Другие последовательности KLK5, упомянутые в настоящем описании, включают SEQ ID NO: 143 (проформа KLK5 человека без сигнальной последовательности) или SEQ ID NO: 142 (полноразмерный KLK5 человека с сигнальной и про-пептидной последовательностями), последовательность, соответствующую Uniprot Q9Y337, или природные варианты, содержащие мутации в положениях 55 и 153 (применительно к SEQ ID NO: 142). Примеры этих мутаций включают KLK5 человека, содержащий остатки 23-293 из SEQ ID NO: 142 с мутациями, заменяющими Gly на Arg в остатке 55 (G55R) и/или Asp на Asn в остатке 153 (D153N).

Антитело согласно настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области, таким как гибридомный 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):7843-7848; WO92/02551; WO2004/051268 и WO2004/106377.

В одном варианте осуществления антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), содержит варибельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельную область 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: 10, или 14, или 23.

В одном варианте осуществления антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), содержит варибельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельную область 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: 23.

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 «стандартно» пронумерованной 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, протягивается от остатка 26 к остатку 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.

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 классической системы комплемента (C1q).

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). Это обозначается в настоящем описании как 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 присутствует константная область или Fc-область, то они 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 и dsscFv), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела или наноантитела (например, VN 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')₂, 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 переменными 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 переменными 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» при использовании в настоящем описании, также охватывает одновалентные антитела, т. е. антитела, содержащие только один антигенсвязывающий домен (например, одноцепочечные антитела, содержащие полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь, соединенные между собой, также называемое «полуантитело»).

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

Термин «полиспецифический» 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 вариабельных доменов, например, часть или все из пары вариабельных 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), Асимметрическую 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, κλ-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, dsscFv, 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-HAS, 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')₂, F(ab')₂-scFv₂, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, четырехвалентное HCAb, sc-Диантитело-Fc, Диантитело-Fc, тандем scFv-Fc; и интраантитело, как описано, например, в Spiess et al., для биспецифических антител. *Mol Immunol.* 67 (2015): 95-106.

Полиспецифические слитые белки включают «Dock and Lock», ImmTAC, HSAbody, sc-Диантитело-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-VHH, 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 VH или VL, или VHH), 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 С-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 С-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 CH2, например, через шарнир фрагмента константной области -CH2CH3.

Используемый в настоящем описании термин Fab-Fv относится к фрагменту Fv с варибельной областью, присоединенной к С-концу каждого из следующих элементов: CH1 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 пегилированной версии.

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

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

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

Используемый в настоящем описании DiFab относится к двум молекулам Fab, связанным через их С-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.

Термин Sc-диантитело-Fc, используемый в настоящем описании, представляет собой два Sc-диантитела, где каждое из них присоединено к N-концу домена CH2, например, посредством шарнира, фрагмента константной области -CH2CH3.

Термин ScFv-Fc-scFv, используемый в настоящем описании, относится к четырем scFv, где по одному из каждого присоединен к N-концу и С-концу как тяжелой, так и легкой цепи фрагмента -CH2CH3.

Термин Sc-диантитело-CH3, используемый в настоящем описании, относится к двум молекулам Sc-диантител, каждая из которых связана, например, шарниром с доменом CH3.

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

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

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

Используемый в настоящем описании термин IgG-V представляет собой полноразмерное антитело с переменным 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 переменными доменами, по одному на

N-конце каждой тяжелой и каждой легкой цепи.

Моноклональное антитело по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой полноразмерное антитело. Более предпочтительно, полноразмерное антитело выбирают из IgG1, IgG4 или IgG4P.

В другом варианте осуществления, моноклональное антитело выбирают из Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dAb или VHH.

В одном варианте осуществления, 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: 30 (нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID NO: 31) и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 (нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID NO: 33).

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

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.

В другом предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), 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 7, или 8, 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29;

где антитело является гуманизированным; более предпочтительно переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, а переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 23.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой полноразмерное антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5) и содержит переменную

область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и где:

а. вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1 или 7, или 8, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. 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 любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29;

где антитело является гуманизированным; более предпочтительно вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, а вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 23. Еще более предпочтительно, полноразмерное антитело выбирают из IgG1, IgG4 или IgG4P.

Используемый в настоящем описании термин «гуманизированное» 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 вариабельной 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, гуманизированное моноклональное 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 гуманизированное моноклональное антитело, которое связывает KLK5, где вариабельный домен содержит акцепторные каркасные области человека и донорные CDR, отличные от человеческих.

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 гуманизированном 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 гуманизированного антитела по настоящему изобретению происходит из зародышевой линии человека IGKV1D-13 JK4, имеющей SEQ ID NO: 138, нуклеотидная последовательность которой показана в SEQ ID NO: 139.

Подходящая каркасная область для тяжелой цепи гуманизированного моноклонального антитела по настоящему изобретению происходит из зародышевой линии человека IGHV3-66JH6, имеющей SEQ ID NO: 140, нуклеотидная последовательность которой показана в SEQ ID NO: 141.

Соответственно, в одном варианте осуществления предложено гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с 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 7, или 8, 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29;

более предпочтительно переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, и переменная область тяжелой цепи содержит CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 23; и где каркасная область легкой цепи происходит от зародышевой линии человека IGKV1D-13 JK4, содержащей SEQ ID NO: 138; и каркасная область тяжелой цепи происходит от зародышевой линии человека IGHV3-66 JH6, содержащей SEQ ID NO: 140.

В гуманизированном моноклональном 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 заменяют на альтернативные аминокислотные остатки.

Соответственно, в одном варианте осуществления предложено гуманизированное моноклональное антитело по настоящему изобретению, в котором по меньшей мере остатки в каждом из положений 24, 48, 49, 71, 73 и 78 (применительно к SEQ ID NO: 140) вариательной области тяжелой цепи представляют собой донорные остатки.

Предпочтительно остаток в положении 24 вариательной области тяжелой цепи представляет собой валин (вместо аланина), остаток в положении 48 представляет собой изолейцин (вместо валина), остаток в положении 49 представляет собой глицин (вместо серина), остаток в положении 71 представляет собой лизин (вместо аргинина), остаток в положении 73 представляет собой серин (вместо аспарагина), и остаток в положении 78 представляет собой валин (вместо лейцина).

Соответственно предложено гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с KLK5, где антитело содержит:

а. вариательную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1 или 7, или 8, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

б. вариательную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29;

более предпочтительно вариательная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, и вариательная область тяжелой цепи содержит CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 23; и где каркасная область легкой цепи происходит от зародышевой линии человека IGKV1D-13 JK4, содержащей SEQ ID NO: 138; и каркасная область тяжелой цепи происходит от зародышевой линии человека IGHV3-66 JH6, содержащей SEQ ID NO: 140, и где аминокислотные остатки положений 24, 48, 49, 71, 73 и 78 (применительно к SEQ ID NO: 140) вариательной области тяжелой цепи являются донорными остатками.

Соответственно, в одном варианте осуществления гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с KLK5, содержит:

а. вариательную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34, или 38, или 42, или 46; и

б. вариательную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32 или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134.

Предпочтительно, гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с KLK5, содержит:

- a. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и
- b. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110.

В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу, содержащему последовательность, которая на 80% аналогична 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: 38. В одном варианте осуществления релевантная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 110.

В одном варианте осуществления моноклональное 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:38, 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: 110.

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 иные, 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 гуманизированному моноклональному антителу, которое связывает KLK5 и содержит:

a. вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1 или 7, или 8, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

b. вариабельную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29;

более предпочтительно вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, и вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 21; и где антитело относится к изоформе IgG4P.

Настоящее изобретение также относится к полноразмерному гуманизированному моноклональному антителу, которое связывает KLK5 и содержит:

a. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 36 или 40, или 44, или 48; и

b. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 52 или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 32 или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134.

Предпочтительно, полноразмерное гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с KLK5, содержит:

a. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40; и

b. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело, которое связывает KLK5, содержит легкую цепь, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходна или идентична последовательности SEQ ID NO: 40, но где антитело имеет последовательность, содержащуюся в SEQ ID NO: 7 (или SEQ ID NO: 1 или 8, или 9) для CDR-L1, последовательность, содержащуюся в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и последовательность, содержащуюся в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3, и тяжелую цепь, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходна или идентична последовательности SEQ ID NO: 112, но где антитело имеет последовательность, содержащую SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 или любую из SEQ ID NO: 10-29 для CDR-H3, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29.

Еще в одном варианте осуществления моноклональное антитело, которое связывается с KLK5, представляет собой фрагмент Fab', содержащий переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело, которое связывается с KLK5, представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

Специалисту в данной области также будет понятно, что антитела могут подвергаться множеству посттрансляционных модификаций. Тип и степень этих модификаций часто зависит 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 другом варианте осуществления моноклональное антитело по настоящему изобретению связывает KLK5 человека, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 144 или 143, или 142, а также связывает KLK5 яванского макака (супо), предпочтительно KLK5 яванского макака, содержащий SEQ ID NO: 151.

В одном варианте осуществления, моноклональное антитело связывается с калликреином 5 (KLK5) человека или яванского макака, 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 7, или 8, или 9, 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 любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36 или

40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

В предпочтительном варианте осуществления, моноклональное антитело связывается с калликреином 5 (KLK5) человека и/или яванского макака, 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: 7, 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: 23; или

б. переменная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 38; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 110; или

с. моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 40; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 112.

В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению не связывает калликреин 2 (KLK2) человека или яванского макака; 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.

Подразумевается, что термин «специфичное», применяемый в настоящем описании, относится к антителу, которое только распознает антиген, к которому оно специфично, или к антителу, которое обладает значительно более высокой аффинностью связывания с антигеном, к которому оно специфично, (например, KLK5) по сравнению с антигенами, к которым оно не специфично (гамма и бета синуклеины), например, с аффинностью связывания по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз выше.

В одном варианте осуществления, моноклональное антитело связывается с KLK5 человека и/или яванского макака, и не связывается с KLK2 человека или яванского макака; или с KLK7 человека или яванского макака, 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 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54,

или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36 или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

В одном варианте осуществления, моноклональное антитело связывается с KLK5 человека и/или яванского макака, и не связывается с KLK2 человека или яванского макака; или с KLK4 человека или яванского макака; или с KLK7 человека или яванского макака, 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: 7, 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: 23; или

б. переменная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 38; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 110; или

с. моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 40; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 112.

В одном варианте осуществления согласно настоящему изобретению связывание антитела с KLK5 характеризуется константой диссоциации (K_D) примерно 7 пМ или менее, предпочтительно примерно 500 пМ или менее, предпочтительно примерно 400 пМ или менее.

Термин « K_D », используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения константы диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (т. е. K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). 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. меньше 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 IC_{50} меньше 800 пМ для блокирования протеазной активности KLK5, предпочтительно, антитело по настоящему изобретению имеет IC_{50} меньше 18 пМ для блокирования протеазной активности KLK5 в анализе *in vitro*, как описано в настоящем документе.

Используемый в настоящем описании термин IC_{50} 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. IC_{50} представляет собой количественную меру, которая показывает, сколько определенного вещества необходимо для подавления данного биологического процесса, функции или активности наполовину.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело, которое связывает KLK5, 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 7, или 8, 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29;

где антитело 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, полагают, что моноклональное антитело по настоящему изобретению связывается с KLK5 и ингибирует (например, полностью или частично) или снижает протеазную активность (предпочтительно активность сериновой протеазы) KLK5; и/или

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

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.

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 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».

Преимущество, связанное с антителом, способным связывать KLK5 и ингибировать биологическую активность KLK5 (т. е. протеазную), 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.

В этих вариантах осуществления фрагмент LEKTI предпочтительно представляет собой домен 5 LEKTI человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 145, или

домен 8 LEKTI, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 152.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело по изобретению связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два или более аминокислотных остатков из группы, состоящей из Leu212, Ser213, Gln214, Lys215, Arg216, Glu218, Asp219, Ala220, Pro222, Gly233, Pro269, Asn270 и Pro272 применительно к SEQ ID NO: 142. Предпочтительно эпитоп характеризуется рентгеноструктурным анализом. Цифры в скобках соответствуют номенклатуре протеаз.

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.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к антителу, которое конкурирует за связывание KLK5, предпочтительно KLK5 человека, путем перекрестного блокирования или будучи перекрестно блокированным антителом, которое связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим аминокислотные остатки Leu212, Ser213, Gln214, Lys215, Arg216, Glu218, Asp219, Ala220, Pro222, Gly233, Pro269, Asn270 и Pro272 применительно к SEQ ID NO: 142, и которое 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: 7, 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: 23; или

2. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110.

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: 110; и/или имеет вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности или сходства с последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 38.

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

Конкурирующие антитела могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего метода в данной области, например, с использованием конкурентных анализов ИФА или ВІАсоре, 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: 144).

Настоящее изобретение также относится к антителу, описанному и заявленному в настоящем документе, образующему комплекс с KLK5, где KLK, предпочтительно KLK5 человека, связан (или может быть связан) с другим антителом, где другое антитело содержит:

1. вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 175, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 176, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 177; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 178, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 179, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 160; и/или

2. вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 161, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 163; и/или

3. вариабельную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 162, и вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 164.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению связывает

KLK5 и 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 или 7, 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: 10-29, предпочтительно, 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

2. варибельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и варибельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134;

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

1. варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 175, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 176, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 177; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 178, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 179, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 160; и/или

2. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 161, и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 163; и/или

3. варибельную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 162, и варибельную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 164.

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

а. KLK5, предпочтительно KLK5 человека; и

б. антитело, которое связывается с KLK5, 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 или 7, 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: 10-29, предпочтительно, 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

2. варибельную область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и варибельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82,

или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; и

с. другое антитело, которое связывается с KLK5, содержит:

1. переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 175, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 176, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 177; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 178, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 179, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 160; где антитело необязательно является гуманизированным; и/или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 161, и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 163; и/или

3. переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 162, и переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 164.

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, как показано в приведенных ниже примерах. В этом отношении такие антитела не конкурируют друг с другом.

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.

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.

Антитела, включая моноклональные антитела, содержат кислотные и/или основные функциональные группы, тем самым придавая 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 моноклональное антитело, связывающее KLK5, по настоящему изобретению может быть сконструировано таким образом, чтобы оно имело 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 варианте осуществления моноклональное антитело, которое связывает KLK5, содержит:

а. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; и

б. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 36 или 40, или 44, или 48; и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 52 или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно, 52 или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136;

где моноклональное антитело сконструировано так, чтобы иметь изoeлектрическую точку, отличную от изoeлектрической 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.

Программы, такие как **ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, и

http://www.iut-arles.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 комбрестины, доластатины, эпотилоны,

стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, халихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопосид, тенопосид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидрокси антрациндион, 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, тиозпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин C и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (AMC), калихеамицины или дуокармицины) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , 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, α -интерферон, β -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 целом 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}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}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, полиалкениленовым 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. Реакционноспособная 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 примерно 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 amino-, imino-, thiol-, hydroxyl- или carboxyl- group. Такие аминокислоты могут иметь природное происхождение во фрагменте антитела или могут быть сконструированы и вставлены во фрагмент с использованием методов рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; W098/25971, WO2008/038024). В одном примере антитело по настоящему изобретению представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, где модификация представляет собой добавление к C-концу его тяжелой цепи одной или более аминокислот для обеспечения возможности присоединения эффекторной молекулы. Соответственно, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или более остатков цистеина, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Множество сайтов может использоваться для присоединения двух или более молекул ПЭГ.

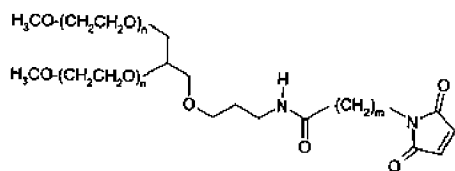
Соответственно, молекулы ПЭГ ковалентно связаны посредством тиольной группы по меньшей мере одного остатка цистеина, локализованного во фрагменте антитела. Каждая полимерная молекула, присоединенная к модифицированному фрагменту антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы остатка цистеина, 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 α -

галогенкарбоновая кислота или сложный эфир, например, йодацетамид, имид, например, 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. содержит ПЭГ (поли(этиленгликоль)), ковалентно присоединенный к нему, 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 20000Да. Суммарная молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab-фрагменту, может, таким образом, составлять приблизительно 40000Да.

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).

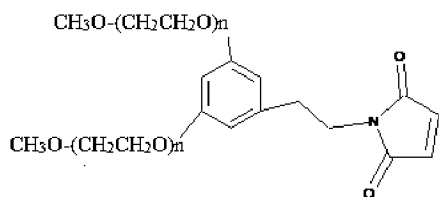
Альтернативные источники ПЭГ-линкеров включают NOF, которые поставляют GL2-400MA3 (где m в структуре ниже составляет 5) и GL2-400MA (где m составляет 2), и n составляет приблизительно 450:



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, -CH2) 3NHCO(CH2)5-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, предлагается scFv, конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина. В одном варианте осуществления, Fab или Fab' согласно настоящему описанию конъюгирован с человеческим сывороточным альбумином. 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:

- а. вариабельную область легкой цепи, где полинуклеотид:
 - i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 31, или 35, или 39, или 43, или 47; или
 - ii. содержит SEQ ID NO: 31 или 35, или 39, или 43, или 47; или
 - iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 31 или 35, или 39, или 43, или 47;

b. вариабельную область тяжелой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

ii. содержит SEQ ID NO: 33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

iii. состоит по существу, из SEQ ID NO: 33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

c. легкую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 37, или 41, или 45, или 49; или

ii. содержит SEQ ID NO: 37 или 41, или 45, или 49; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 37, или 41, или 45, или 49; или

d. тяжелую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137; или

ii. содержит SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельную область тяжелой цепи Fab'-фрагмента антитела или антитела IgG1 или IgG4 по настоящему изобретению, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135. Также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи Fab'-фрагмента антитела или IgG1, или IgG4 по настоящему изобретению, которая включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 или 35, или 39, или 43, или 47.

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, представленную в SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:

37, или 41, или 45, или 49.

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: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135 или 137.

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 трансфецирована выделенными полинуклеотидными последовательностями или экспрессирующими векторами согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой клетку CHO-DG44, стабильно трансфецированную экспрессирующими векторами, содержащими выделенные полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению, предпочтительно содержащие выделенные полинуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129,

131, 133, 135 или 137.

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 моноклонального антитела, и выделение полученного таким образом моноклонального 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 трансфецировать 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 моноклональное антитело, связывающее KLK5, предпочтительно KLK5 человека, такое как гуманизированное моноклональное антитело, в частности антитело по изобретению, по существу очищенное от эндотоксина, в частности свободное или практически свободное от эндотоксина и/или белок или ДНК клетки-хозяина, где моноклональное антитело связывается с KLK, предпочтительно с KLK5 человека, и содержит:

а. вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

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:

а. вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

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:

а. переменную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36 или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136;

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

Предпочтительно фармацевтическая композиция содержит антитело, которое связывает KLK5, где антитело связывается с KLK5, предпочтительно с KLK5 человека, и указанное антитело содержит переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 38 и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 110.

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 будет составлять от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, например, 0,1 мг/кг - 200 мг/кг, как например, 100 мг/кг. Фармацевтические композиции могут быть представлены стандартным образом в единых 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, с помощью инъекции или инфузии, например, с помощью болюсной инъекции или продолжительной инфузии, внутривенно, ингаляцией или подкожно. 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. Альтернативно, антитело по изобретению может быть представлено в сухой форме для восстановления перед использованием с помощью подходящей стерильной жидкости. Также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования 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 моноклональному антителу, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, и содержит:

а. переменную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-

16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

b. варибельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и варибельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

c. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

В предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, и содержит:

1. варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, и где варибельная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 23; или

2. варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

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, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества моноклонального антитела, которое связывается с KLK5, где антитело связывается с KLK5, предпочтительно в KLK5 человека, и содержит:

a. варибельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и варибельную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

b. варибельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34,

или 38, или 42, или 46; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

В другом аспекте предложено моноклональное антитело, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, или фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело, где моноклональное антитело или композиция предназначены для лечения одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, где антитело содержит:

а. переменную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

В одном 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, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека и содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 23; или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

В другом предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, или фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело, где указанное антитело или фармацевтическая композиция предназначены для лечения одного или более заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, 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: 7, 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: 23; или

2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110; или

3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

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 моноклонального антитела, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, или фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело, где антитело или фармацевтическая композиция содержит:

а. переменную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

b. вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

c. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

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

В другом аспекте предложено моноклональное антитело, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, или фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело, причем указанное антитело или фармацевтическая композиция 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 комбинация, и где моноклональное антитело или фармацевтическая композиция содержит:

a. вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

b. вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

c. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108,

или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

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, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективное количество антитела, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, или фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело, где антитело или фармацевтическая композиция содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 23; или
2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110; или
3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

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

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения предложено антитело, которое связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, или фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело, где указанное антитело или фармацевтическая композиция 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 комбинация, где антитело или фармацевтическая композиция содержит:

1. переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и где переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 23; или
2. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110; или
3. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.

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

Альтернативно, изобретение также относится к применению антитела, которое

связывает KLK5, предпочтительно KLK5 человека, или к фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело, где антитело или фармацевтическая композиция для производства 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 комбинацию, более предпочтительно синдром Нетертона и/или атопический дерматит, где антитело содержит:

а. переменную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

Настоящим изобретением также предусмотрено применение антитела, которое связывает KLK5, где антитело связывается с KLK5, предпочтительно с KLK5 человека, 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 рак мочевого пузыря.

Более предпочтительно моноклональное антитело содержит:

а. переменную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34,

или 38, или 42, или 46; и вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

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 называют 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) риск развития заболевания, характеризующиеся нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5, или подвержен ли он этому риску.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, которое связывает KLK5, где антитело связывается с LK5, предпочтительно с KLK5 человека, где антитело предназначено для применения в 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, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря, где антитело содержит:

а. вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 1, или 7, или 8, или 9, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 3; и вариабельную область 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29; или

б. вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32, или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134; или

с. легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь содержит SEQ ID NO: 36, или 40, или 44, или 48; и тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52, или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.

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

Таблица 1

Название	SEQ ID NO:	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
CDR-L1	1	QSSQSVYNNNDLA
CDR-L2	2	RASTLAS
CDR-L3	3	LGGYDDVDVDTYT
CDR-H1	4	GFSLSYGM
CDR-H2	5	IISSSGSTYYASWAKG
CDR-H3	6	DHIYRYDDYGDYPTYYGMDP
CDR-L1 Q1R	7	RSSQSVYNNNDLA
CDR-L1 Q1K	8	KSSQSVYNNNDLA
CDR-L1 Q1H	9	HSSQSVYNNNDLA
CDR-H3 D19N	10	DHIYRYDDYGDYPTYYGMNP
CDR-H3 D19E	11	DHIYRYDDYGDYPTYYGMEP
CDR-H3 Y4F	12	DHIFRYDDYGDYPTYYGMDP
CDR-H3 Y6F	13	DHIYRFDDYGDYPTYYGMDP

CDR-H3 Y9F	14	DHIYRYDDFGDYPTYYGMDP
CDR-H3 Y12F	15	DHIYRYDDYGDFTYYGMDP
CDR-H3 Y15F	16	DHIYRYDDYGDYPTFYGMDP
CDR-H3 Y16F	17	DHIYRYDDYGDYPTYFGMDP
CDR-H3 T14N	18	DHIYRYDDYGDYPNYYGMDP
CDR-H3 T14V	19	DHIYRYDDYGDYPVYYGMDP
CDR-H3 T14S	20	DHIYRYDDYGDYPSYYGMDP
CDR-H3 Y4F/D19N	21	DHIFRYDDYGDYPTYYGMP
CDR-H3 Y6F/D19N	22	DHIYRFDDYGDYPTYYGMP
CDR-H3 Y9F/D19N	23	DHIYRYDDFGDYPTYYGMP
CDR-H3 Y12F/D19N	24	DHIYRYDDYGDFTYYGMP
CDR-H3 Y15F/D19N	25	DHIYRYDDYGDYPTFYGMP
CDR-H3 Y16F/D19N	26	DHIYRYDDYGDYPTYFGMP
CDR-H3 T14N/D19N	27	DHIYRYDDYGDYPNYYGMP
CDR-H3 T14V/D19N	28	DHIYRYDDYGDYPVYYGMP
CDR-H3 T14S/D19N	29	DHIYRYDDYGDYPSYYGMP
VL кролика	30	AVVLTQTPSPMSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNDLAWY QQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISG VQCDDAATYYCLGGYDDDVDYTFGGGTEVVVK
VL кролика нуклеотидная последовательность	31	Geagtcgtgctgactcagacaccatcacccatgctgcagctgtgggagggcacagtcac catcagttgccagtcagtcagagtggttataataataaacgacttagcctggatcagcaga aaccagggcagcctcctaagctcctgatctacagggcatccactctggcatctggggctc cgtcgcgggtcagcggcagtggtatgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtg cagtgtagcagtgctgccacttactactgtctagggcgttatgatgatgatgttgatagctat acttcggcggaggaggaccgaggtgggtggtcaaa
VH кролика	32	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYGMSWVRQA PGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKSTSTVDLKIA SPTTEDTATYFCARDHIYRYDDYGDYPTYYGMDPWGPG TLVTVSS
VH кролика нуклеотидная последовательность	33	Cagtcgggtggaggagtcgggggctgcctggtcacgcctgggacacccctgacactca cctgcacagtccttgattctccctcagtagctatggaatgagctgggtccgccaggtcc agggaaggggctggaatggatcggaattattagtagtggttagcacatactacgcga gctggggcgaaaggccgattcaccatctccaagacctcgaccacgggtggatctgaaaatc gccagtcgcacaaccgaggacacggccacctatttctgtgccagagatcacatttatagg tacgatgactatggtgattaccctactactacggcatggaccctggggcccaggcacc ctgggtcaccgtctcgagc

10273 gL2 VL	34	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDDVDITYTFGGGKVEIK
10273 gL2 VL нукл.	35	Gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacc atcacctgtcagtcgagccagtcagtgatacaacaacgacctggcctggatcagcag aagccgggaaaggctcccaagttgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagt gcctagccgctttccgggtccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagccttca accggaggacttcgccacttactactgctgggcgggttacgatgacgatgtggacaccta caccttcggcggaggggaccaaagtggaaatcaag
10273 gL2 Легкая цепь	36	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDDVDITYTFGGGKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10273 gL2 Легкая цепь нукл.	37	Gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacc atcacctgtcagtcgagccagtcagtgatacaacaacgacctggcctggatcagcag aagccgggaaaggctcccaagttgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagt gcctagccgctttccgggtccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagccttca accggaggacttcgccacttactactgctgggcgggttacgatgacgatgtggacaccta caccttcggcggaggggaccaaagtggaaatcaagcgtacggtggccgctccctccgtgt tcatttcccacctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccgctcgtgtgctgc tgaacaacttctacccccgcaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgca gtccggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacctactcc ctgtctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgctg cgaagtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgag tgc
10273 gL2 VL Q1R	38	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDDVDITYTFGGGKVEIK
10273 gL2 VL Q1R нукл.	39	Gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacc atcacctgtcggtcgagccagtcagtgatacaacaacgacctggcctggatcagcag aagccgggaaaggctcccaagttgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagt gcctagccgctttccgggtccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagccttca accggaggacttcgccacttactactgctgggcgggttacgatgacgatgtggacaccta caccttcggcggaggggaccaaagtggaaatcaag
10273 gL2 Легкая цепь Q1R	40	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDDVDITYTFGGGKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10273 gL2 Легкая цепь Q1R нукл.	41	gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacca tcacctgtcggtcgagccagtcagtgatacaacaacgacctggcctggatcagcaga agccgggaaaggctcccaagttgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagt cctagccgctttccgggtccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagccttca ccggaggacttcgccacttactactgctgggcgggttacgatgacgatgtggacacctac accttcggcggaggggaccaaagtggaaatcaagcgtacggtggccgctccctccgtgt catcttcccacctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccgctcgtgtgctgct gaacaacttctacccccgcaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcag tccggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacctactccct gtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgctcgcg

		aagtgaccaccaggggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtg c
10273 gL2 VL Q1K	42	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDVDITYTFGGGTKVEIK
10273 gL2 VL Q1K нукл.	43	gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacca tcacctgtaaatcgagccagtcagtgatacaacaacaacgacctggcctggatcagcaga agccgggaaaggtcccaagtgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagtg cctagccgcttttccgggtccggatctggcaccgacttactctaccatttcgagccttcaa ccggaggacttcgccacttactactgctgggcggttacgatgacgatgtggacacctac accttcggcgaggaggaccaaagtggaaatcaag
10273 gL2 Легкая цепь Q1K	44	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDVDITYTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10273 gL2 Легкая цепь Q1K нукл.	45	gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacca tcacctgtaaatcgagccagtcagtgatacaacaacaacgacctggcctggatcagcaga agccgggaaaggtcccaagtgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagtg cctagccgcttttccgggtccggatctggcaccgacttactctaccatttcgagccttcaa ccggaggacttcgccacttactactgctgggcggttacgatgacgatgtggacacctac accttcggcgaggaggaccaaagtggaaatcaagcgtacgggtggcgctccctccgtgtt catcttcccacctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtcgtgtgcctgct gaacaacttctacccccgcgaggccaaggtgcagtgaaggtggacaacgccctgcag tccggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacctactccct gtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcg aagtgaccaccaggggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtg c
10273 gL2 VL Q1H	46	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCHSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDVDITYTFGGGTKVEIK
10273 gL2 VL Q1H нукл.	47	gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacca tcacctgtcactcgagccagtcagtgatacaacaacaacgacctggcctggatcagcaga agccgggaaaggtcccaagtgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagtg cctagccgcttttccgggtccggatctggcaccgacttactctaccatttcgagccttcaa ccggaggacttcgccacttactactgctgggcggttacgatgacgatgtggacacctac accttcggcgaggaggaccaaagtggaaatcaag
10273 gL2 Легкая цепь Q1H	48	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCHSSQSVYNNNDLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLGGYDDDVDITYTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10273 gL2 Легкая цепь Q1H нукл.	49	gccattcaactgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacca tcacctgtcactcgagccagtcagtgatacaacaacaacgacctggcctggatcagcaga agccgggaaaggtcccaagtgctgatctaccgggacctcaacgctcgcgtcgggagtg cctagccgcttttccgggtccggatctggcaccgacttactctaccatttcgagccttcaa ccggaggacttcgccacttactactgctgggcggttacgatgacgatgtggacacctac accttcggcgaggaggaccaaagtggaaatcaagcgtacgggtggcgctccctccgtgtt catcttcccacctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtcgtgtgcctgct gaacaacttctacccccgcgaggccaaggtgcagtgaaggtggacaacgccctgcag

		tccggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacctactccct gtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcg aagtgaccaccaggccctgtccagccccgtgaccaagtccttaaccggggcgagtgc
10273 gH1 VH	50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYGYM DPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH нукл.	51	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggtgcagccaggcgggaagcctcaggt tgtcctgcgcggtgtcagggttcagcctgtcgtcataggaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctcgggtccacctactacgc ctcttgggccaaggacgggttcacatttcgaaggacagctcgaagaacaccgtgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattacccgacttactacggaatggaccctgggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь	52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYGYM DPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSTLTK
10273 gH1 Тяжелая цепь нукл.	53	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggtgcagccaggcgggaagcctcaggt tgtcctgcgcggtgtcagggttcagcctgtcgtcataggaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctcgggtccacctactacgc ctcttgggccaaggacgggttcacatttcgaaggacagctcgaagaacaccgtgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattacccgacttactacggaatggaccctgggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaaggccctcctgttccctctgg ccccttgcctccgggtccacctccgagtctaccgcccgtctgggtgcttggtcaaggact acttccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcac accttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtgcc ctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaaca ccaaggtggacaagcggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcccctgcc cctgaatttctggcgacgttccgtgttctgttcccccaaggccaaggacacctga tgatctcccggacccccgaagtacctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatccc gaggtcagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcacc aggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaagaaggcctgcctc cagcatcgaagaccatctccaaggccaaggccagccccgcgagccccaggtgta caccctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgg tcaagggttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtcacaacggccagcccag aacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcagggctccttcttctgtactctc ggctgacctggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgttcttctgtcctgctcgtgatg cacgaggccctgcacaaccctacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH D19N	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV

		YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH D19N нукл.	55	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggcagccaggcgggaagcctcaggt tgtcctgcgcgggtgcagggttcagcctgtcgtcataggaatgtcctgggtcagacagg ccctggcaaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctccgggtccacctactacgc ctcttgggccaaggacgggttcaccattcgaaggacagctcgaagaacaccgtgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattacccgacttactacggaatgaaccctgggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь D19N	56	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь D19N нукл.	57	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggcagccaggcgggaagcctcaggt tgtcctgcgcgggtgcagggttcagcctgtcgtcataggaatgtcctgggtcagacagg ccctggcaaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctccgggtccacctactacgc ctcttgggccaaggacgggttcaccattcgaaggacagctcgaagaacaccgtgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattacccgacttactacggaatgaaccctgggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagc gcttctacaaaggccccctcgtgttccctctggccccctgtctccgggtccacctccgagt ctaccgccgctctgggtgcctgggtcaaggactactccccgagcccggtgacagtgtcct ggaaactctggcgccttgacctccggcgtgcacaccttccctgcccgtgctgacgtcctccg gcctgtactcctgtcctccgtgtgacctgcccctcctcagcctgggcaccaagacct cacctgtaacgtggaccacaagccccccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatct aagtacggccctccctgccccccctgcccctgcccctgaatttctggcgggaccttccgtgt tctgttcccccaaaagcccaaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtacact gctgtgtgtgtggacgtgtcccaggaagatcccagggtccagttcaattgtgactggac ggcgtggaagtgcacaatccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactccacct accgggtgtgtcctgtgtgacctgtgtgaccaggactggctgaacggcgaagagta caagtgaaggtgtccaacaagggcctgccctccagcatgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagccccgcgagccccagggtgtacacctgccccctagccaggaagaga tgaccaagaaccagggtgtccctgacctgtctgtgcaagggttctaccctccgacattgc cgtggaatgggagtcacaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtg ctggacagcagcggctccttctcctgtactctcggtgacctggacaagtcccgggtgg caggaaggcaacgtcttctcctgtccgtgatgcagggccctgcacaaccactacac ccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH D19E	58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM EPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH D19E нукл.	59	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggcagccaggcgggaagcctcaggt tgtcctgcgcgggtgcagggttcagcctgtcgtcataggaatgtcctgggtcagacagg ccctggcaaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctccgggtccacctactacgc

		ctcttgggccaaagggacgggtcaccattcgaaggacagctcgaagaacaccgtgtatctgcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcacatctaccgctatgacgactacggcgattacccgacttactacggaatggagccctggggccaaggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь D19E	60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYGMEPWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь D19E нукл.	61	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggcagccaggcggaaagcctcaggtgtcctgcgcgggtgcagggtcagcctgtcgtacataggatgtcctgggtcagacaggccctggcaaagccctgagtgattgggatcatctcctcctccgggtccactactacgctcttgggccaaagggacgggtcaccattcgaaggacagctcgaagaacaccgtgtatctgcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcacatctaccgctatgacgactacggcgattacccgacttactacggaatggagccctggggccaaggcaccactgtgactgtctcgagc gcttctacaaagggccctcctgtgttccctctggcccttgcctccgggtccactccgagctaccgccgctctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgagcccggtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagctcctccggcctgtactcctctcctcctcgtgaccgtgccctcctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatctaatgacggccctcctgccccccctgccctgccctgaattctggcgggaccttccgtgtcctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctcccgagccccgaagtgcctgcgtgggtgggtggacgtgtcccaggaagatcccagggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactccactaccgggtgggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaaagagtaaaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccctccagatcgaaaagacctctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgggtcaagggttctaccttccgacattgcgtggaatgggagtccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttcttctgtactctcggctgaccgtggacaagtcccgggtgcaggaaggcaacgttctcctgtccgtgatgcagagggcctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH4 VH	62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYGMDPWGQGTTVTVSS
10273 gH4 VH нукл.	63	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggcagcccggaggatccctgaggctttcttgtgccgctccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagcaccaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctcctcctcgggtcaactactacgctcatgggccaagggccgggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctcaaatgaactcgtgcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacatctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggacccttggggacaggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH4	64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYGMSWVR

Тяжелая цепь		QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM DPWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH4 Тяжелая цепь нукл.	65	gaagtgcagctcgtcgaatccggtggcgactggtgcagcccgaggatccctgaggc ttcttctgcccgcctccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagc accaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctcctcgggtcgaactactacgc gtcatgggccaaggcggttcaccattagcaaggacagctccaagaactgtgtacc tccaatgaactcgtcggggtgaggacaccgctgtactactgcggcgatcac atctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggaccttgggga cagggcaccactgtgactgtctcagcgccttctacaaggcgccctcctgttccctctgg ccccttctcccggccacctccgagctaccgctcgtgggtgctggtcaaggact acttccccgagccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcac accttccctgcccgtgctgcagctcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgccc ctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaaca ccaagggtggacaagcggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcccctgcc cctgaatttctggcgacacctcctgttctgttcccccaagcccaaggacacctga tgatccccggacccccgaagtacctgctggtggtggactgtcccaggaagatccc gaggtccagttcaattgtactgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcc cagagaggaacagtccaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcacc aggactggctgaacggcgaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgcctc cagcatgaaaagacctctccaaggccaaggccagccccgcgagccccaggtgta caccctgccccctagccagggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgg tcaagggttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagcccag aacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcagggctccttcttctgtactctc ggctgacctggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgttctctctgctccgtgatg cacgaggccctgcacaacctacacctcagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH4 VH D19N	66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGMWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM NPWGQGTTVTVSS
10273 gH4 VH D19N нукл.	67	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggtgcagccaggcggaagcctcaggt tgtcctgcgcgggttcagggttcagcctgtcgtcatacggaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctcgggtccacctactacgc ctcttgggccaagggttcaccattcgaaggacagctcgaagaacacctgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtccccgcgacac atctaccgctatgacgactacggcgattacccgacttactacggaatgaaccttggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH4 Тяжелая цепь D19N	68	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGMWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM NPWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

		DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
10273 gH4 Тяжелая цепь D19N нукл.	69	gaagtgcagctcgtcgaatccggagggtgactgggtgcagccaggcggaagcctcaggt tgtcctgcgcgggttcagggttcagcctgtcgtcatcagggaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaaggccttgagtggattggatcatctcctcctcgggtccactactacgc ctcttgggccaagggttcacatttcgaaggacagctcgaagaacaccgtgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtccccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattaccgacttactacggaatgaaccctgggggt caaggcaccactgtgactgtctcagcgccttctacaaaggccctcctgttccctctgg ccccttgcctccgggtccacctccgagctctaccgccgctctgggtgcttggtcaaggact acttccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcac accttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactcctgtcctcctgctgacctgccc ctcctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaactgggaccacaagccctccaaca ccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcccctgcc cctgaatttctggcgacacctcctgttctgttcccccaagcccaaggacacctga tgatccccggacccccgaagtacctgcgtgggtgggtgacgtgtcccaggaagatccc gagggtccagttaattggtacctggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccacctaccgggtgggtgtccgtgctgacctgctgcacc aggactggctgaacggcgaagagtacaagtcaaggtgtccaacaaggcctgcctc cagcatcgaagaccatccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgta cacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccagggtgtccctgacctgtctgg tcaagggttctaccctccgacattgccgtggaatgggagtcacaaggccagcccag aacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttctctgtactctc ggctgacctgggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctcctgctccgtgatg cacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH5 VH	70	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWVGISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYG MDPWGQGTTTVTVSS
10273 gH5 VH нукл.	71	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactgggtgcagcccgaggatccctgaggc ttcttgtgccgtgtccgggttctcctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtgggtcggaattatctcctcctcgggtcaacctactacgg tcatgggccaaggccgggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggaccttggggac agggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH5 Тяжелая цепь	72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWVGISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYG MDPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
10273 gH5	73	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactgggtgcagcccgaggatccctgaggc

Тяжелая цепь нукл.		ttcttgtgccgtgtccgggttcctcctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaaggggtctggagtggtcggaattatctcctcctcggtcaacctactacggt tcatgggccaagggccggtcaccattagcaaggacagctccaagaacctgtgtacctc caaatgaactcgtcgcgggtgaggacaccgctgtactactgcgcccgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggaccttggggac agggcaccactgtgactgtctcgagcgcttctacaaagggccctccgtgttccctctggc cccttgcctccgggtccacctccgaggtaccgctctgggtgcctgtgtaaggacta cttccccgagcccggtgacagtgctctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcaca ccttccctgccgtgtgagtcctccggcctgtactccctgtctccgtgtgacctgtccc tctccagcctgggccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacac caaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctcctgccccctgacctgccc ctgaatttctggcggtaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgat gatctcccggtgaccccggaagtgtacctgctgtgtgtggacgtgtcccaggaagatccc aggtccagttcaattgtgtacgtggacggcgtggaagtgcacaatccaagaccaagccc agagaggaaacagttcaactccacctaccgggtgtgtgtccgtgtgacctgtgtcacca ggactgggtgaacggcaaagagtacaagtcaagggttccaacaagggcctgacctcc agcatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtac acctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgt caagggttctacctctccgacattgccgtggaatgggagtcacaagccagccccgaga acaactacaagaccacccccctgtgtgtggacagcgaggtctcttctgtactctcg gctgacctggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgttctctgtccctgatgc acgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgacctgggcaag
10273 gH5 VH D19N	74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWVGISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYG MNPWGQGTTTVTVSS
10273 gH5 VH D19N нукл.	75	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggtgcagccaggcgggaagcctcaggt tgtctgcgcggtgtcagggttcagcctgtcgtcatacgaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaaggccttgagtggtcgggatcatctcctcctccgggtccacctactacg cctcttgggccaagggtgacgttcaccattcgaaggacagctcgaagaacacctgtatc tgcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattaccgacttactacggaatgaaccctggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH5 Тяжелая цепь D19N	76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWVGISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYG MNPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
10273 gH5 Тяжелая цепь D19N нукл.	77	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggtgcagccaggcgggaagcctcaggt tgtctgcgcggtgtcagggttcagcctgtcgtcatacgaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaaggccttgagtggtcgggatcatctcctcctccgggtccacctactacg cctcttgggccaagggtgacgttcaccattcgaaggacagctcgaagaacacctgtatc tgcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattaccgacttactacggaatgaaccctggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaagggccctccgtgttccctctgg

		ccccttgctcccggtccacctccgagctctaccgccgctctgggctgcctggtaaggact acttccccgagcccggtgacagtgctctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcac accttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgccc ctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaaca ccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgacctgcc cctgaatttctggggcgaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctga tgatctcccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccaggaagatccc gaggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcacc aggactggctgaacggcaagagtagaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccctc cagcatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgta caccctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgg tcaagggttctaccttccgacattgccgtggaatgggagtgccaacggccagcccag aacaactacaagaccacccccctgtgtggacagcgacggctccttcttctgtactctc ggctgacctggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgttctctgtctcctgatg cacgaggccctgcacaacctacacccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH8 VH	78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYGYM DPWGQGTTVTVSS
10273 gH8 VH нукл.	79	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagccccggaggatccctgaggc ttcttgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctctctcctgggctcaacctactacgg tcatgggccaagggcggttcaccattagccgggacagctccaagaacactgtgtacct ccaaatgaactcgtcggggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcatcaca tctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggaccttggggac agggcaccactgtgactgtctcgcgc
10273 gH8 Тяжелая цепь	80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYGYM DPWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
10273 gH8 Тяжелая цепь нукл.	81	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagccccggaggatccctgaggc ttcttgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctctctcctgggctcaacctactacgg tcatgggccaagggcggttcaccattagccgggacagctccaagaacactgtgtacct ccaaatgaactcgtcggggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcatcaca tctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggaccttggggac agggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaagggccccctccgtgttccctctggc ccttgcctcccggtccacctccgagctctaccgccgctctgggctgcctggtaaggacta ctccccgagcccggtgacagtgctctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcaca ccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgccc tctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacac caaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgacctgcc ctgaatttctggggcgaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgat

		gatctcccgacccccgaagtgaacctgcgtggtggtggacgtgtcccaggaagatccc aggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagccc agagaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtcaaggtgtccaacaaggcctgccctcc agcatcgaagagaccatctccaaggccaaggccagccccgcagccccaggtgtac accctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggt caagggtcttaccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagccccgaga acaactacaagaccacccccctgtgtgtggacagcgacggctccttctctgtactctcg gctgacctggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctctgtccgtgatgc acgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH8 VH D19N	82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH8 VH D19N нукл.	83	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggtgcagccaggcggaaagcctcaggt tgtctctgcgcggtgtcagggttcagcctgtcgtcataggaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctccgggtccacctactacgc ctcttgggccaaggacgggttcaccatttcgcgggacagctcgaagaacaccgtgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattaccgacttactacggaatgaaccctggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH8 Тяжелая цепь D19N	84	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH8 Тяжелая цепь D19N нукл.	85	gaagtgcagctcgtcgaatccggaggtggactggtgcagccaggcggaaagcctcaggt tgtctctgcgcggtgtcagggttcagcctgtcgtcataggaatgtcctgggtcagacagg cccctggcaaaggccttgagtggattgggatcatctcctcctccgggtccacctactacgc ctcttgggccaaggacgggttcaccatttcgcgggacagctcgaagaacaccgtgtatct gcagatgaacagcctgcgggcagaggacaccgctgtgtactactgtgcccgcgatcac atctaccgctatgacgactacggcgattaccgacttactacggaatgaaccctggggt caaggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaaggccccctcgtgttcctctgg ccccttgctcccgggtccacctccgagtctaccgccgctctgggctgcttggtcaaggact acttccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcac accttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtgtgacctgccc ctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaaca ccaagggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgccctgcc cctgaatttctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctga tgatctcccgacccccgaagtgaacctgcgtggtggtggacgtgtcccaggaagatccc gaggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcc cagagaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcacc aggactggctgaacggcaaagagtacaagtcaaggtgtccaacaaggcctgccctc cagcatcgaagagaccatctccaaggccaaggccagccccgcagccccaggtgta caccctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgg

		tcaagggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtgccaacggccagcccag aacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttcttctgtactctc ggctgaccgtggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgttcttctgtccgtgatg cacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH10 VH	86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYGYM DPWGQGTTTVTVSS
10273 gH10 VH нукл.	87	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagcccggaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgag tcatgggccaaggccgggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactttgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggacccttggggac agggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH10 Тяжелая цепь	88	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYGYM DPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
10273 gH10 Тяжелая цепь нукл.	89	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagcccggaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgag tcatgggccaaggccgggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactttgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatggacccttggggac agggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaagggccccctcgtgttccctctggc cccttgcctccgggtccacctccgagctaccgccgtctgggtgcctggtaaggacta cttccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcggtgcaca ccttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtgcc tctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacac caaggtggacaagcgggtggaatctaagtagggccctccctgccccctgccctgcc ctgaatttctgggaggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgat gatctcccgacccccgaagtgcctgcgtggtggtagctgtcccagggaagatccc agggtccagttcaattgtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagccc agagaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtcaaggtgtccaacaagggcctgccctcc agcatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcagccccaggtgtac acctgccccctagccagggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggt caagggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtgcaacggccagccccgaga acaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttcttctgtactctg gctgaccgtggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgttcttctgtccgtgatgc acgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH10 VH D19N	90	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTL

		YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH10 VH D19N нукл.	91	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgcg tcatgggccaagggccgggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactttgtacctc caaatgaactcgtcgcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacactactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH10 Тяжелая цепь D19N	92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGM ^{SVR} QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGT ^{TKTY} TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS ^{VL} TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYK ^{TTTP} VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH10 Тяжелая цепь D19N нукл.	93	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgcg tcatgggccaagggccgggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactttgtacctc caaatgaactcgtcgcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacactactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaggggccctcgtgttccctctggcc ccttgtccccgtccacctccgagctaccgccgtctgggctgctgtgtaaggactact tccccgagcccgtagacgtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacacc ttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactccctgtcctcgtcgtgaccgtgcctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgccctgccct gaatttctgggcggaccttccgtgttctgttccccccaaagcccaaggacacctgatga tctccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatcccag gtccagttcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag agaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccagg actggctgaacggcaaaagagtacaagtcaaggtgccaacaaggccctgccctccag catcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgta agggcttctaccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagcccagaaac aactacaagaccacccccctgtgtgtggacagcgacggctcttcttctgtactctcggc tgaccgtggacaagtcccggtggcaggaaggcaacgtcttctctgtccgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH11 VH	94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGM ^{SVR} QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN ^{SKNTV} YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYYGM DPWGQGTTTVTVSS
10273 gH11 VH нукл.	95	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgcg tcatgggccaagggccgggtcaccattagccgggacaactccaagaacactgtgtacctc

		caaatgaactcgctcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgacctactacggaatggaccctggggac agggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH11 Тяжелая цепь	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYGM DPWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH11 Тяжелая цепь нукл.	97	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactgggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacg tcatgggccaaggccgggttcaccattagccgggacaactccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgctcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgacctactacggaatggaccctggggac agggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaagggccctcgtgttccctctggc cccttgcctccgggtccacctccgagctaccgccgtctgggtgcctggtaaggacta cttccccgagccgtgacagtgtcctggaactctggcgcctgacctccggcgtgcaca ccttccctgccgtgtcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgccc tctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacac caagggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgccctgcc ctgaattctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgat gatctcccgacccccgaagtgaactgcgtgggtggtagctgtccaggaagatcccg agggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggagtgacaaatgccaagaccaagccc agagaggaacagttcaactccacctaccgggtgggtgtccgtgctgacctgctgcacca ggactggctgaacggcaagagtagaagtcaaggtgccaacaagggcctgccctcc agcatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtac acctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtg caagggttctaccctccgacattgccgtggaatgggagtcacaagccagccccgaga acaactacaagaccacccccctgtgtggacagcgaggtccttcttctgtactctcg gctgacctgggacaagtccgggtggcaggaaggcaacgtcttctctgtccgtgatgc acgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH11 VH D19N	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYGM NPWGQGT TVTVSS
10273 gH11 VH D19N нукл.	99	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactgggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacg tcatgggccaaggccgggttcaccattagccgggacaactccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgctcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgacctactacggaatgaaccctggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH11 Тяжелая цепь D19N	100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYYGM

		NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK
10273 gH11 Тяжелая цепь D19N нукл.	101	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgcccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaaggggtctggagtgatcggaattatctcctcctcgggctcaacctactacgcg tcatgggccaagggccgggtcaccattagccgggacaactccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcgcgggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgcagcgttctacaaaggccccctcgtgttccctctggcc ccttgcctcccggtccacctccgagcttaccgccgtctggggtgcctgggtcaaggactact tccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacacc ttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactcctgtcctccgtcgtgaccgtgcctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcctgccccct gaattctggggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctcccgaccctccgaagtgcctgcgtggtgggtgacgtgtccaggaagatcccgag gtccagttcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag agaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtcgtgtgaccgtgtgcaccagg actggctgaacggcaaagagtacaagtcaagggttccaacaagggcctgccctccag catcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgca agggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtcacaagccagccccgagaac aactacaagaccacccccctgtgtgacagcgacggctccttcttctgtactctcggc tgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgttctcctgtcctgtagtcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH Y4F D19N	102	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIFRYDDYGDYPTYYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH Y4FD19N нукл.	103	Gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgagg cttctgtgcccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagc accaggaaaggggtctggagtgatcggaattatctcctcctcgggctcaacctactacgc gtcatgggccaagggccgggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacc tccaaatgaactcgtcgcgggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcac atcttcgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatgaaccttgggga cagggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь Y4FD19N	104	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIFRYDDYGDYPTYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

		GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь Y4FD19N нукл.	105	gaagtgcagctcgtcgaatccggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttcttggtccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgcg tcatgggccaagggcggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat cttccgctatgatgactacggggactaccgacctactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgcagcgttctacaaggggccccctcggttccctctggcc ccttgctcccggtccacctccgagtctaccgccgctctggggtgcttggtcaaggactact tccccgagcccgtagacgtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcggtgcacacc ttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgctgtgaccgtgccctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgacctgccct gaatttctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaaggccaaggacacctgatga tctcccgacccccgaagtgcctgcgtggtgggtggacgtgtccagggaagatcccgag gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag agaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgtctgcaccagg actgggtgaacggcaagaggtacaagtcaagggtgtccaacaagggcctgccctccag catcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgta agggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagttccaacggccagcccgagaac aactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttctctgtactctcggc tgaccgtggacaagtcccggtggcaggaaggcaacgttctcctgtccgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH Y6F D19N	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRFDDYGDYPTYYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH Y6FD19N нукл.	107	Gaagtgcagctcgtcgaatccggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc cttcttggtccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagc accaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgc gtcatgggccaagggcggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacc tccaaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcac atctaccgctttagtactacggggactaccgacctactacggaatgaaccttggggga cagggcaccactgtgactgtctcgcagc
10273 gH1 Тяжелая цепь Y6FD19N	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRFDDYGDYPTYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTKTYTCNV D HKPSNTKVDKR VESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS VLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь Y6F D19N	109	gaagtgcagctcgtcgaatccggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttcttggtccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacgcg

нукл.		tcatgggccaagggccggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcgcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctttgatgactacggggactaccgacctactacggaatgaacccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgcttctacaaggccccctccgtgttccctctggcc ccttgcctcccggtccacctccgagtctaccgccgctctgggctgcttggtcaaggactact tccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcggtgcacacc ttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgctgtgaccgtgccctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgccctgccct gaatttctgggaggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctccggacccccgaagtacctgcgtggtgggtggacgtgtccagggaagatcccagag gtccagttcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag agaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgtgtgcaccagg actgggtgaacggcaagagtagaagtcaaggtgtccaacaagggcctgccctccag catcgaagaccatctccaaggccaaggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgta agggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagccccgagaac aactacaagaccacccccctgtgtgtggacagcgacggctccttcttctgtactctggc tgacctggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctctgtcctgatgcac gagggcctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH Y9F D19N	110	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDFGDYPTYYGM NPWGQGTTVTVSS
10273 gH1 VH Y9FD19N нукл.	111	Gaagtgcagctcgtcgaatccggtggcggactggtgcagcccggaggatccctgagg ctttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagc accaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctcctcctgggctcaacctactacgc gtcatgggccaagggccggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacc tccaaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcac atctaccgctatgatgacttcggggactaccgacctactacggaatgaacccttgggga cagggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь Y9FD19N	112	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDFGDYPTYYGM NPWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь Y9FD19N нукл.	113	gaagtgcagctcgtcgaatccggtggcggactggtgcagcccggaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctcctcctgggctcaacctactacgcg tcatgggccaagggccggtcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcgcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgacttcggggactaccgacctactacggaatgaacccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgcttctacaaggccccctccgtgttccctctggcc ccttgcctcccggtccacctccgagtctaccgccgctctgggctgcttggtcaaggactact tccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcggtgcacacc

		ttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactcctgtcctccgtcgtgaccgtgccctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgccctgccct gaattcttgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctccggacccccgaagtgcctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatcccagag gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag agaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccagg actggctgaacggcaagagtacaagtcaagggtgtccaacaaggcctgccctccag catgaaaagaccatctccaaggccaaggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtca agggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagttcaacggccagcccagaaac aactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctcttcttctgtactctcgge tgaccgtggacaagtcccggtggcaggaaggcaacgtcttctctgtccgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH Y12F D19N	114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDFTYYGM NPWGQGTTVTVSS
10273 gH1 VH Y12FD19N нукл.	115	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagccccggaggatccctgagge tttcttgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctctctcctgggtcaacctactacggt tcatgggccaaggccgggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggacttcccgacctactacggaatgaacccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь Y12FD19N	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDFTYYGM NPWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь Y12FD19N нукл.	117	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagccccggaggatccctgagge tttcttgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaaggggtctggagtggatcggaattatctctctcctgggtcaacctactacggt tcatgggccaaggccgggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggacttcccgacctactacggaatgaacccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaggccctccgtgtccctctggcc ccttgtccccgtccacctccgagctaccgccgtctgggtgctgtcaaggactact tccccgagccccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacacc ttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactcctgtcctccgtcgtgaccgtgccctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgccctgccct gaattcttgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctccggacccccgaagtgcctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatcccagag gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag

		agaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccagg actggctgaacggcaagagtagaagtgaagggtgtccaacaaggcctgccctccag catcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtca agggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagccccgagaac aactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttctctgtactctcggc tgaccgtggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgtcttctcctgtccgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH Y15F D19N	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTFYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH Y15FD19N нукл.	119	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagccccggaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctcctcgggtcaacctactacgcg tcatgggccaagggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgccccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgacctctacggaatgaaccctggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь Y15FD19N	120	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTFYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTKTYTCNV D HKPSNTKVDKR VESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS VLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K
10273 gH1 Тяжелая цепь Y15FD19N нукл.	121	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcgactggtgcagccccggaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctcctcgggtcaacctactacgcg tcatgggccaagggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcgggctgaggacaccgccgtgtactactgcgccccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgacctctacggaatgaaccctggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgttctacaaagggccccctcgtgttccctctggcc ccttgcctccgggtccacctccgagctacccgctctgggctgcttggtcaaggactact tccccgagcccgtagacgtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacacc ttccctgccgtgctgcagctcctccggcctgtactcctgtctcctcgtgaccgtgcctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtagcgccctccctgccccccctgccctgccct gaatttctgggcggaccttccgtgttctgttccccccaaagcccaaggacacctgatga tctcccggaacccccgaagtgaacctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatcccgag gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagccag agaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccagg actggctgaacggcaagagtagaagtgaagggtgtccaacaaggcctgccctccag catcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtca agggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagccccgagaac aactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttctctgtactctcggc

		tgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctctgctccgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH Y16F D19N	122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYFGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH Y16FD19N нукл.	123	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacggt tcatgggccaagggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgctgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacactctcggaatgaaccctggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь Y16FD19N	124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTYFGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь Y16FD19N нукл.	125	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcgggctcaacctactacggt tcatgggccaagggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgctgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgacactctcggaatgaaccctggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgcttctacaaaggccccctcgtgttccctctggcc ccttgcctccgggtccacctccgagcttaccgctctggggtgctggtcaaggactact tccccgagcccgtagactgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacacc ttccctgccgtgctgcagctcctcggcctgtactcctgtctcctgctgaccgtgcctc ctccagcctggggaccaagacctacacctgtaactggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgcctgccccct gaattctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatcccgag gtccagttcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcacaatccaagaccaagccag agaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccagg actggctgaacggcaaagagtacaagtcaagggttccaacaaggcgctgccctccag catgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgca agggttctacctctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagccccgagaac aactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttctctgtactctcggc tgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctctgctccgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH T14ND19N	126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPNYYGM NPWGQGTTTVTVSS

10273 gH1 VH T14ND19N нукл.	127	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagccccggaggatccctgaggc tttcttggtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcctgggctcaacctactacggt tcatgggccaagggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcggccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgaactactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь T14ND19N	128	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPNYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS VLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K
10273 gH1 Тяжелая цепь T14ND19N нукл.	129	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagccccggaggatccctgaggc tttcttggtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcctgggctcaacctactacggt tcatgggccaagggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcggccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgaactactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgcttctacaaagggccccctcgtgttccctctggcc ccttgctccccgggtccacctccgagcttaccgccgtctggggtgcctggtaaggactact tccccgagccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcggtgcacacc ttccctgccgtgctgcagctcctccggcctgtactcctgtcctccgtcgtgaccgtgcctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgcctgccccct gaatttctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctcccgacccccgaagtgacctgcgtgggtgggtggacgtgtccaggaagatcccgag gtccagttcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagccag agaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtcctgctgacctgctgcaccagg actggctgaacggcaaagagtacaagtcaaggtgtccaacaagggcctgccctccag catcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgta agggcttctacccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagccccgagaac aactacaagaccacccccctgtgctggacagcgagcgtccttcttctgtactctcggc tgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctcctgtccctgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH T14V D19N	130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLR AEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPVYYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH T14VD19N нукл.	131	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagccccggaggatccctgaggc tttcttggtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggctctggagtggatcggaattatctctctcctgggctcaacctactacggt tcatgggccaagggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcggccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactacccgggtgtactacggaatgaaccttggggaca

		gggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь T14VD19N	132	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPVYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
10273 gH1 Тяжелая цепь T14VD19N нукл.	133	gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttctgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctctcctgggctcaacctactacgcg tcatgggccaagggcggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccgggtgtactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcgagcgcttctacaaggggccccctcggttccctctggcc ccttgcctccgggtccacctccgagcttaccgccgctctggggtgctgtcaaggactact tccccgagccgtgacagtgtctggaactctggcgccctgacctccggcggtgcacacc ttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtgccctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcctgccct gaatttctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctcccgacccccgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccaggaagatcccag gtccagttcaattgtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag agaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtcgtgctgacctgtctgcaccagg actgggtgaacggcaagagtagacaagtcaagggtgtccaacaaggccctgccctccag catcgaaaagaccatctccaaggccaaggccagccccgcgagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgta agggcttctacctctccgacattgccgtggaatgggagtcacaagccagcccagagaac aactacaagaccacccccctgtgtgtagacagcgagcgtccttcttctgtactctcggc tgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgttcttctgtcctgtatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
10273 gH1 VH T14S D19N	134	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPSYYGM NPWGQGTTTVTVSS
10273 gH1 VH T14SD19N нукл.	135	Gaagtgcagctcgtcgaatccgggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgagg cttctgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagc accaggaaagggtctggagtggatcggaattatctctctcctgggctcaacctactacgc gtcatgggccaagggcggttcaccattagcaaggacagctccaagaacactgtgtacc tccaaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgcccgcgatcac atctaccgctatgatgactacggggactaccgctcctactacggaatgaaccttgggga cagggcaccactgtgactgtctcgagc
10273 gH1 Тяжелая цепь T14SD19N	136	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGMSWVR QAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPSYYGM NPWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

		SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK
10273 gH1 Тяжелая цепь T14SD19N нукл.	137	gaagtgcagctcgtcgaatccggtggcggactggtgcagcccgaggatccctgaggc tttcttgtgccgtgtccgggttctccctgagctcctacgggatgtcgtgggtcagacaagca ccaggaaagggtctggagtggatcggaattatctcctcctgggtcaacctactacgag tcatgggccaaggccggttcaccattagcaaggacagctccaagaacctgtgtacctc caaatgaactcgtcggggtgaggacaccgccgtgtactactgcgccccgcatcacat ctaccgctatgatgactacggggactaccggtcctactacggaatgaaccttggggaca gggcaccactgtgactgtctcagcgcttctacaaggccccctcgtgtccctctggcc ccttgtccccgtccacctccgagctaccgccgtctgggtgctggtcaaggactact tccccgagccccgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacacc ttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtgccctc ctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacca aggtggacaagcgggtggaatctaagtaggccctccctgccccccctgccctgccct gaatttctgggaggaccttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatga tctcccgacccccgaagtgcctgctgggtgggtggacgtgtccagggaagatcccgag gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccag agaggaaacagttcaactccacctaccgggtggtgtcctgtgctgacctgtgtgcaccagg actggctgaacggcaagagtagaagtcaagggttccaacaaggcctgccctccag catcgaagaccatctccaaggccaaggccagccccgcagccccaggtgtacac cctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgta agggcttctaccctccgacattgccgtggaatgggagtgcaacggccagccccgagaac aactacaagaccacccccctgtgtggacagcgacggctccttcttctgtactctggc tgacctggacaagtcccgtggcaggaaggcaacgtcttctcctgtccgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
Каркас акцептора IGKV1D-13 JK4 человека	138	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
Каркас акцептора IGKV1D-13 JK4 человека нукл.	139	gccatccagttgaccagtcctccatcctcctgtctgcactctgtaggagacagagtcacca tcaattgccgggcaagtgcaggcattagcagtgctttagcctggtatcagcagaaccag ggaaagctcctaagctcctgatctatgatgcctccagtttgaaagtggggtcccatcaag gttcagcggcagtgatctgggacagattcactctccatcagcagcctgcagcctga agattttgcaacttattactgtcaacagtttaatagtacctctcactttcggcggaggacc aagggtggagatcaaa
Каркас акцептора IGHV3-66 ЖН6 человека	140	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVR QAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYYYYYGMDVWGQGTTV TVSS
Каркас акцептора IGHV3-66 ЖН6 человека нукл.	141	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtccagcctgggggggtccctgagac tctcctgtgcagcctctggtatccagctcagtagcaactacatgagctgggtccgcccaggc tccagggaaggggctggagtgggtctcagttattatagcgggtgtagcacatactacgc agactcctggaaggcagattccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctt caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagatactactac tactacgggtatggacgtctgggggcaagggaccacgggtcaccgtctcctca
KLK5 человека	142	MATARPPWMWVLCALITALLGVTEHVLANNVSCDH PSNTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRIINGSDCDMH

(полноразмерный с сигнальной последовательностью)		TQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTKDVRPINVSSHCHPSAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSQCQGDSSGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS
KLK5 человека проформа	143	VTEHVLANNNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTKDVRPINVSSHCHPSAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSQCQGDSSGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS
Активный KLK5 человека	144	IINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTKDVRPINVSSHCHPSAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSQCQGDSSGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS
LEKTI D5 человека Fc кролика	145	EIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEEKKKAEARARNLEKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWENKGAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
KLK7 человека проформа	146	EEAQGDKIIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAHCKMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVKLISPQDCTKVYKDLENSMLCAGIPDSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWINDTMKKHR
Активный KLK7 человека	147	IIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAHCKMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVKLISPQDCTKVYKDLENSMLCAGIPDSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWINDTMKKHR
KLK7 яванского макака проформа	148	GQEAQGDKIIDGAPCTRGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAHCKMNDYIVHLGSDTLGDRKAQRIKASRSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSPARLSSTVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVKLISSQDCTKVYKDMLGNSMLCAGIPNSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWINDTIKKHR
Активный KLK7 яванского макака	149	IIDGAPCTRGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAHCKMNDYIVHLGSDTLGDRKAQRIKASRSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSPARLSSTVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVKLISSQDCTKVYKD

		MLGNSMLCAGIPNSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVS WGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWINDTIKKHR
Активный KLK5 мыши	150	IVNGSDCQKDAQPWQGALLGPNKLYCGAVLISPQWLL TAAHCRKPVFRIRLGHHSMSPVYESGQQMFQGIKSIPHP GYSHPGHSNDLMLIKMNRKIRDSHSV KPV EIA CD CATEG TRCMVSGWGTTSSSHNNFPKVLQCLNITVLSEERCKNSY PGQIDKTMFCAGDEEGRDSCQGDSGGPVVCNGKLQGLV SWGDFPCAQRNRPGVYTNLCEFEVKWIKDTMNSN
Активный KLK5 яванского макака	151	IINGSDCDEHTQPWQAALLGPNQLYCGGVLVHPQWLL TAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGIKSIPHP GYSHPGHSNDLMLIKLNRRIHSTKDV RPIN VSSH CPS AGT KCLVSGWGTTTRSPQVHFPKVLQCLNISVLSQKRCE DAYP RQIDDTMFCAGDEAGR DSC QGDSGGPVVCNGSLQGLVS WGDYPCAKPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS
ЛЕКТИ D8 человека Fc кролика	152	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKM HGN KCAMCASVFKLEEEEEKNDKEEK GKVEAEKVLEKT VAP STCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIR VVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKAR GQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVE WEKNGKAEDNYKTTPAVLDS DGS YFLYSKLSVPTSEWQ RGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
10273 mIgG кролика Легкая цепь	153	AVVLTQTPSP MSAAVGGTVT ISCQSSQSVY NNNDLAWYQQ KPGQPPKLLI YRASTLASGV PSRFSGSGSG TQFTLTISGV QCDDAATYYC LGGYDDDDVDYTFGGGTEVV VKRTDAAPT SIFPPSSEQL TSGGASV VCF LNNFY PKDIN VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSK DCTYSM SSTLT LTKDE YERHNSYTCE ATHKTSTSPI VKSFNRNEC
10273 mIgG кролика Тяжелая цепь	154	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YGMSWVRQAP GKGLEWIGII SSSGSTYYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIA SPTTEDTATY FCARDHIYRY DDYGDYPTYY GMDPWGPGTL VTVSSAKTTP PSVYPLAPGS AAQTNSMVT GCLVKGYFPE PVTVTWNSGS LSSGVHTFPA VLQSDLYTLS SSVTVPSSTW PSETVTCNVA HPASSTKV D KIVPRDCGCK PCICTVPEVS SVFIFPPKPK DVLITITLTPK VTCVVVDISK DDPEVQFSWF VDDVEVHTAQ TQPREEQFNS TFRSVSELP I MHQDWLNGKE FKCRVNSAAF PAPIEKTISK TKGRPKAPQV YTI PPPKEQM AKDKVSLTCM ITDFFPEDIT VEWQWNGQPA ENYKNTQ PIM DTDGSYFVYS KLVNQKSNWE AGNTFTCSVL HEGLHNHHT E KSLSHSPGK
10273 mIgG кролика Легкая цепь Нукл.	155	gcagtcgtgctgactcagacacccatgctgctgcagtcgtgggaggcacagtcac catcagttgccagtcagtcagagtggttataataataacgacttagcctggatcagcaga aaccagggcagcctcctaagtcctgatctacagggcatccactctggcatctggggtcc cgtcgcgggtcagcggcagtggtatctgggacacagtcactctcaccatcagcggcgtg cagtgtagcagtgctgccactactactgtctaggcgggtatgatgatgatgtgatacgtat actttcggcggaggaggaggtggtggtcaaacgtacggatgctgcaccaactgtatc catcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttctga acaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaa

		atggcgctctgaacagttggactgatcaggacagcaagactgcacctacagcatgagc agcaccctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggc cactcacaagacatcaactcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtgt
10273 mIgG кролика Тяжелая цепь Нукл.	156	cagtcggtggaggagtccgggggtcgctggtcacgcctgggacaccctgacactca cctgcacagtccttgattctccctcagtagctatggaatgagctgggtccgccaggctcc aggggaaggggtcgaatggatcgggaattattagtagtagtggtacacatactacgcga gctgggcgaaaggccgattcaccatctccaagacctcgaccacgggtggatctgaaaatc gccagtccgacaaccgaggacacggccacctattctgtgccagagatcacatttatagg tacgatgactatggtgattaccctacactacggcatggaccctggggcccaggcacc ctggtcaccgtctcgagtgccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggat ctgctgccc aaactaactccatggtgacctgggatgcctggtcaagggtatttccctga gccagtgcagtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagc tgtctgcagtcgtgacctctacactctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctgg cccagcgagaccgtcacctgcaacggtgccaccggccagcagcaccagggtggac aagaaaattgtgccagggtgtggtgtgaagccttgcatagtacagtcccagaagtatc atctgtcttcatcttcccccaagcccaaggatgtgtcaccattactctgactcctaaggt cacgtgtgtgtggttagacatcagcaaggatgatcccagggtccagttcagctggtttgta gatgatgtggaggtgcacacagctcagacgcaacccgggaggagcagttcaacagca cttccgctcagtcagtgaaactcccatcatgcaccaggactggctcaatggcaaggagtt caaatgcagggtcaacagtgcagcttccctgcccccatcgagaaaacctctccaaaac caaaggcagaccgaaggctccacaggtgtacaccattccacctcccaaggagcagatg gccaaggataaagtcagtcgtgacctgcatgataacagacttcttccctgaagacattactgt ggagtggcagtggaatgggcagccagcggagaactacaagaactcagcccatcatg gacacagatggctcttacttctgtctacagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggag gcaggaaatacttccactgctctgtgttacatgagggcctgcacaaccaccatactgaga agagcctctcccactctctggtaaa
10236 mIgG кролика Легкая цепь	157	AYDMTQTPAS VEVAVGGTVT IKCQASQSIG SWLAWYQQKP GQPPKLLIYL ASTLASGVSS RFKGSQSGTQ FTLTISGVEC ADAATYYCQQ GYTNSNIINT FGGGTEVVVK RTDAAPT VSI FPPSSEQLTS GGASVVCFLN NFYPKDINVK WKIDGSRQN GVLNSWTDQD SKDCTYSMSS TLTLTKDEYE RHNSYTCEAT HKTSTSPIVK SFNRNEC
10236 mIgG кролика Тяжелая цепь	158	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFPLSN YAMSWVRQAP GKGLEWIGDI YPSDIIDYAS WAKGRFTISQ TSTTVELKIT GPTTEDTATY FCARDNNDYG LDIWGPGLTV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVKGYFPEP VTVTWNSSGL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK TGRPKAPQVY TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTK SLSHSPGK
10236 mIgG кролика Легкая цепь	159	gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtgggaggcacagtcacc atcaagtgccaggccagtcagagcattagcagttggttagcctggtatcagcagaaacca ggtcagcctcccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctgggggtctcatcgc ggttcaaaggcagtggtatcgggacacagttcactctcaccatcagcggcggtggagtgtg

Нукл.		ccgatgctgccacttactactgtcaacagggttataactaataagtaataattattaataactttcgg cggaggaggaccgaggtggtggtcaaacgtacggatgctgcaccaactgtatccatcttccc accatccagtggagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttctgaacaacttct accccaaagacatcaatgtcaagtggagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtc ctgaacagttggactgatcaggacagcaaagactgcacctacagcatgagcagcacct cacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctataacctgtgaggccactcaca agacatcaacttcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg
10236 mIgG кролика Тяжелая цепь Нукл.	160	cagtcggtggaggagtcggtgggtgcctggtcacgcctgggacacccctgacactca cctgcaccgtctctgggttccccctcagtaattatgcaatgagctgggtcggcagggtcc agggaaggggctggaatggatcggagacattatcctagtatacatagactacgcgag ctgggcgaaaggccgattcaccatctccaaacctcgaccaggtggagctgaaaatca cgggtccgacaaccgaggacacggccacctatttctgtccagagacaacaatgactat ggctcggacatctggggcccaggcacctgggtcaccgtctcagtgccaaaacgacacc cccatctgtctatccactggccccctggatctgctgccccaaactaactccatggtgacctg ggatgctggtcaagggtatttccctgagccagtacagtgacctggaactctggatcc ctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctgacctctacactctgagca gtcagtgactgtccccccagcacctggcccagcagaccgtcacctgcaacgttgcc caccggccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtcccagggtggtgtgttaa gccttgcatatgtacagtcccagaagtatcatctgtcttcatcttcccccaaagcccaagg atgtgctcaccattactctgactcctaagggtcacgtgtgtgtggttagacatcagcaaggat gateccgaggtccaggtcagctggtttgtagatgatgtggaggtgcacacagctcagacg caacccggggaggagcagttcaacagcacttccgctcagtcagtgaaacttcccatcatg caccaggactggctcaatggcaaggagttcaaatgcagggtcaacagtgacgtttccct gccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaggcagaccgaagggtccacaggtgt acaccattccacctcccaaggagcagatggccaaggataaagtcagctgtacctgcatg ataacagacttcttccctgaagacattactgtggagtggcagtggaatgggcagccagc gagaactacaagaacactcagcccatcatggacacagatggctcttacttctgtacagc aagtcattgtgcagaagagcaactgggaggcaggaaatacttccactgtctgtgttac atgagggcctgcacaaccaccatactgagaagagccttcccactctcctgttaaatgat cccagtgctcttgagccctctggtcctacaggactctgacacctacctccacccctccct gtataaa
10236 Легкая цепь Fab	161	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSWLAWYQQ KPGQPPKLLIYLASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVE CADAATYYCQQGYTNSNIINTFGGGTEVVVKRTPVAPT VLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGT TQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYT CKVTQGTTSVVQSFNRGDC
10236 Легкая цепь Fab Нукл.	162	gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtgggaggcacagtcacc atcaagtgccaggccagtcagagcattagcagttggttagcctggatcagcagaaacca ggtcagcctcccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctgggtctcatcgc ggttcaaaggcagtgatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtggagtggtg ccgatgctgccacttactactgtcaacagggttataactaataagtaataattattaataactttcgg cggaggaggaccgaggtggtggtcaaacgtacggcagttgcacctactgtcctcatcttccc accagctgctgatcaggtggcaactggaacagtcaccatcgtgtgtgtggcgaataaata ctttcccgatgtcaccgtcacctgggaggtggatggcaccaccaaaactggcatcga gaacagtaaaacaccgcagaattctgcagattgtacctacaacctcagcagcactctgac actgaccagcacacagtacaacagccacaaagagtagacctgcaagggtgaccaggggc acgacctcagtcgtccagagcttcaataggggtgactgt
10236 тяжелая цепь Fab	163	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSNYAMSWVRQA PGKGLEWIGDIYPSDIIIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKIT GPTTEDTATYFCARDNNDYGLDIWGPGLTVTVSSGQPK APSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNS

		GTLTNGVVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVA HPATNTKVDKTVAPSTCSKP
10236 тяжелая цепь Fab Нукл.	164	cagtcggtggaggagtcggggggtgcctggtcacgcctgggacaccctgacactca cctgcaccgtctctgggttccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgccaggctcc agggaaggggctggaatggatcggagacattatcctagtatcatagactacgcgag ctggggcgaaaggccgattcaccatctccaaacctcgaccacgggtggagctgaaaatca cgggtccgacaaccgaggacacggccacctatttctgtgccagagacaacaatgactat ggctcggacatctggggcccaggcaccctggtcaccgtctcagtgggcaacctaaaggc tccatcagtcctccactggccccctgctgcggggacacaccagctccacgggtgacct gggctgcctggcacaaggctacctcccgagccagtgaccgtgacctggaactcgggc acctcaccatggggtagcaccttcccgctccggcagtcctcaggcctctactcg ctgagcagcgtggtagcgtgacctcaagcagccagcccgctcactgcaacgtggccc accagccaccaacaccaaagtggacaagaccgttgcgcctcgcacatgcagcaagcc c
10273 Легкая цепь Fab	165	AVVLTQTPSPMSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNDLAWY QQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISG VQCDDAATYYCLGGYDDDDVDYTFGGGTEVVVKRTPV APTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVD GTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKE YTCKVTQGTTSSVVQSFNRGDC
10273 Легкая цепь Fab Нукл.	166	gcagtcgtgctgactcagacaccatcacctatgtctgcagctgtgggaggcacagtcac catcagttgccagtcagtcagagtggttataataataacgacttagcctggtatcagcaga aaccagggcagcctcctaagctcctgatctacagggcacaccttggtatctgggggtcc cgtcgcgggtcagcggcagtggtatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtg cagtgtagcagtgctgccactactactgtctaggcgggtatgatgatgatgttgatagctat acttccggcggaggaccgaggtgggtggtcaaacgtacgccagttgcacctactgtcctc atctcccaccagctgctgatcagtggtgcaactggaacagtcaccatcgtgtgtgtggcg aataaatacttcccgatgtcaccgtcacctgggaggtggatggcaccacccaacaact ggcagcgagaacagtaaaacaccgcagaattctgcagattgtacctacaacctcagcagc actctgacactgaccagcacacagtacaacagccacaagagtagacctgcaaggtgac ccagggcacgacctcagtcgtccagagcttcaatagggggtgactgt
10273 тяжелая цепь Fab	167	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYGMSWVRQA PGKGLEWIGIISSTGYASWAKGRFTISKSTSTVDLkia SPTTEDTATYFCARDHIYRYDDYGDYPTYYGMDPWGPG TLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGY LPEPVTVTWNSGTLTNGVVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVS TSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKP
10273 тяжелая цепь Fab Нукл.	168	cagtcggtggaggagtcggggggtgcctggtcacgcctgggacaccctgacactca cctgcacagtcctctggtattctccctcagtagctatggaatgagctgggtccgccaggctcc agggaaggggctggaatggatcgggaattattagtagtggtagcacatactacgcga gctgggcgaaaggccgattcaccatctccaagacctcgaccacgggtgatctgaaaatc gccagtcgacaaccgaggacacggccacctatttctgtgccagagatcacatttatagg tacgatgactatggtgattacctactactacggcatggaccctggggcccaggcacc ctggtcaccgtctcagtggtggcaacctaaaggctccatcagtcctccactggccccctgct gcggggacacaccagctccacggtgacctgggctgcctgggtcaaggctacctccc ggagccagtgacctgacctggaactcgggcacctcaccatggggtagcaccttcc cgctccgtccggcagtcctcaggcctctactcgtgagcagcgtggtagcgtgacctcaa gcagccagcccgctcacctgcaacgtggcccaccagccaccaacaccaaagtggaca agaccgttgcgcctcgcacatgcagcaagccc
Human LEKTI D5 Fab H chain	169	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQ APGKGLEWIGIHWASGTTFYATWAKGRFTISRDNSSGGG SGGGGSREIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRPGDG

		KMHGNLC SMCQAYFQAENEEKKKAEARARSGGGGGG GGSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFD LWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCHH HHHHHHHH
ЛЕКТИ D5 человека Fab L цепь	170	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCQSSPSVWSNFLSWYQQ KPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
кролик/челов ек химерная легкая цепь (hCK S171C) 10236	171	AYDMTQTPASVEVA VGGTVTIKCQASQSISSWLAWYQQ KPGQPPKLLIYLASTLASGVSSRFKSGSGGTQFTLTISGVE CADAATYYCQQGYTNSNIINTFGGGTEVVVKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
кролик/челов ек химерная тяжелая цепь 10236	172	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFPLSNYAMSWVRQA PGKGLEWIGDIYPSDIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKIT GPTTEDTATYFCARDNNDYGLDIWGPGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALH NHYTQKSLSLSLGK
ЛЕКТИ D5Fc TEV	173	EIVKLC SQYQNQA KNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLC SMCQAYFQAENEEKKKAEARARNLEENLYFQGV DKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K
ЛЕКТИ D8Fc TEV	174	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGN KCAMCASVFKLEEEEEKNDKEEKGVAEKVLEENLYF QGV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
10236 CDR-L1	175	QASQSISSWLA
10236 CDR-L2	176	LASTLAS

10236 CDR-L3	177	QQGYTNSNIINT
10236 CDR-H1	178	GFPLSNYAMS
10236 CDR-H2	179	DIYPSDIIDYASWAKG
10236 CDR-H3	180	DNNDYGLDI
10236 VL кролика	181	AYDMTQTPASVEVA VGGTVTIKCQASQSISSWLAWYQQ KPGQPPKLLIYLASTLASGVSSRFKSGSGTGFTLTISGVE CADAATYYCQQGYTNSNIINTFGGGTEVVVK
10236 VL кролика нукл.	182	gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtgggaggcacagtcacc atcaagtgccaggccagtcagagcatttagcagttggtagcctggtatcagcagaaacca ggtcagcctcccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctggggtctcatcgc gggtcaaaggcagtggtatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcggtggagtg ccgatgctgccacttactactgtcaacagggttataactaatagtaataattataactttcgg cggaggggaccgaggtggtggtcaaacgtacg
10236 VH кролика	183	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSNYAMSWVRQA PGKGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKIT GPTTEDTATYFCARDNNNDYGLDIWGPGLTVTVSS
10236 VH кролика нукл.	184	cagtcggtggaggagtcggggggtcgctggtcacgcctgggacaccctgacactca cctgcaccgtctctgggtccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgccaggctcc agggaaagggctggaatggatcggagacattatcctagtatcatagactacgcgag ctgggcgaaaggccgattcaccatctccaaacctcgaccacgggtggagctgaaaatca cgggtccgacaaccgaggacacggccacctatttctgtgccagagacaacaatgactat ggtctggacatctggggcccaggccacctggtcaccgtctcgagt
KLK7 мыши проформа	185	QGERIIDGYKCKEGSHPWQVALLKGNQLHCGGVLDVK YWVLTAACHCKMGQYQVQLGSDKIGDQSAQKIKATKSF RHPGYSTKTHVNDIMLVRLDEPVKMSSKVEAVQLPEHC EPPGTSTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCSDVKLISSRECK KVYKDLLGKTMLCAGIPDSKTNTCNGDSGGPLVCNDTL QGLVSWGTYPCGQPNPDGVYTQVCKYKRWVMETMKTHR
Активный KLK7 мыши	186	IIDGYKCKEGSHPWQVALLKGNQLHCGGVLDVKYWVL TAACHCKMGQYQVQLGSDKIGDQSAQKIKATKSF RHPGYSTKTHVNDIMLVRLDEPVKMSSKVEAVQLPEHC EPPGTSTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCSDVKLISSRECK KVYKDLLGKTMLCAGIPDSKTNTCNGDSGGPLVCNDTL QGLVSWGTYPCGQPNPDGVYTQVCKYKRWVMETMKTHR

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: 142, 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: 150 и 151, соответственно.

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

Нуклеотидные последовательности домена 5 и домена 8 LEKTI 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 С-концевым Fc-фрагментом кролика (SEQ ID NO: 145) или последовательность домена 8 LEKTI с С-концевым Fc-фрагментом кролика (SEQ ID NO: 152). Кодируемые белки будут обозначаться как LEKTI D5 Fc кролика и LEKTI D8 Fc кролика, соответственно.

KLK5, слитые белки LEKTI домен 5 Fc кролика и LEKTI домен 8 Fc кролика экспрессировали путем транзиторной трансфекции с использованием системы экспрессии Expi293TM (Life TechnologiesTM) в соответствии с протоколом производителя. Во время экспрессии KLK5 автоматически активируется с образованием активного KLK5 (содержащего SEQ ID NO: 144 или остатки I67-S293 SEQ ID NO: 142) 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 человеческий (мыши или яванского макака) активный KLK5, 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: 145), сначала подвергали аффинной хроматографии с Протеином А. Супернатанты загружали в колонки HiTrapTM 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: 152) очищали аналогичным образом из супернатантов трансфицированных клеточных культур.

Слитую молекулу LEKTI D5 Fab (согласно SEQ ID NO: 169 и 170) 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 Н-цепи Fab. Последовательность тяжелой цепи слитого белка 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 солевым градиентом, созданным в общей сложности на 10 объемах колонки, с использованием буфера А (20 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl) и буфера В (20 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, генерируя про-KLK7 (содержащий SEQ ID NO: 146 и 148, соответственно). В отличие от KLK5, KLK7 не активируется сам во время экспрессии, поэтому активные формы KLK7 человека, мыши и яванского макака (содержащие SEQ ID NO: 147, 184 и 149, соответственно) были созданы с использованием термолизина для отщепления последовательности пропептида от очищенных белков. Белки про-KLK7 человека, мыши и яванского макака (содержащие SEQ ID NO: 146, 185 и 148, соответственно), разбавляли до 1 мг/мл активационным буфером (50 mM Tris, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,05% Brij 35). Термолизин (25 мг) от Sigma™ ресуспендировали в 25 мл буфера для расщепления (50 mM Tris, pH 8, 0,5 mM CaCl₂), добавляли в соотношении 1:10 к соответствующим белкам KLK7 на 45 минут при 37°C перед смешиванием с анионообменной смолой DEAE (GE Life Sciences™) для связывания и удаления термолизина. Элюат собирали в виде активного KLK7 (человека, мыши или яванского макака).

Активные формы KLK7 человека, мыши и яванского макака были заменены буфером на 50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl, 5% глицерин, 1 mM EDTA и концентрировали примерно до 3, 2 мг/мл.

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

KLK4 человека был получен от R&D Systems™ (каталожный номер 1719-SE) в

виде проформы и активирован следующим образом. Про-KLK4 человека разбавляли до 200 мкг/мл в 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7,5. и бактериальный термолизин был получен от R&D SystemsTM (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 с помощью 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 (SigmaTM). Животным с интервалом в 21 день вводили повторные инъекции, содержащие 100 мкг того же иммуногена, смешанного с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда (SigmaTM). Терминацию проводили 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 (ДМСО) 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 (GibcoTM) с добавлением 200 мкл/лунку 10% FCS (Sigma AldrichTM), 2% раствор HEPES (Sigma AldrichTM), 2% раствор L-глутамина (GibcoTM), 1% раствор пенициллина/стрептомицина (GibcoTM), 0,2% нормоцин (InvivogenTM), 0,1% β-меркаптоэтанол (GibcoTM), 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-миристат-13-ацетата (PMA) и фитогемагглютинаина-L (PHA-L) в течение 6 дней перед сбором супернатанта. Планшеты инкубировали шесть дней при 37°C и 5% CO₂. Культуры были созданы с использованием В-клеток от всех иммунизированных животных, и в общей сложности было проскринировано примерно 1×10⁹ 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 LabtechTM), покрытых биотинилированным человеческим KLK5 в качестве источника целевого антигена и гранул стрептавидина Sol-R4 (TTP LabtechTM), покрытых родственным KLK7 для встречного скрининга. Lightning-Link Rapid Biotin Type B (ExpedeonTM) 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 ImmunoResearchTM). Через 1 час инкубации планшеты считывали на приборе с зеркальным шаром (TTP-LabtechTM).

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 BiomekNXPTM, 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 микрообъемного флуоресцентного анализа (FMAT). На короткое время 10 мкл супернатанта переносили на черные планшеты Greiner со штрих-кодом. 50 мкл/планшет 10 мкм суперавидина (Bangs BeadsTM) покрывали биотинилированным KLK5 человека, смешанным с Alexa-647TM-меченым козьим антителом против кроличьего Fc-фрагмента IgG (Jackson ImmunoResearchTM). Затем добавляли супернатант и планшеты считывали с помощью Applied BiosystemsTM Cellular Detection System 8200.

Ряд антител был идентифицирован как связывающиеся с KLK5, и впоследствии были исследованы 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 AldrichTM) наносили покрытие в виде F(ab')₂ -фрагмента козьего антитела против Fc-фрагмента IgG (Jackson ImmunoResearchTM) в концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере и оставляли на ночь при 4°C. Планшеты промывали 3 раза на устройстве для промывки планшетов BiotekTM с помощью PBS/0,1% Tween-20 и блокировали 20 мкл/лунку PBS/1% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в планшеты добавляли супернатанты В-клеток, а в контрольные лунки добавляли 25 мкл 1 нМ слитого белка LEKTI D5 Fc кролика в качестве положительного контроля для ингибирования и буфера А для анализа (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (об./об.) Tween-20, pH 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 BiotekTM путем добавления смеси PBS/0,1% Tween-20, 10 мкл 250 пМ человеческого KLK5 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 BiochemicalsTM) в аналитическом буфере А добавляли в лунки до конечной концентрации 600 мкМ и определяли флуоресценцию (λ_{ex} 380 нм λ_{em} 430 нм) через 4 часа с использованием планшет-ридера PHERAStar FSX (BMG LabtechTM).

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 извлечения вариабельной области.

Чтобы идентифицировать клетки, секретирующие специфические антитела, чтобы обеспечить извлечение 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 BiolabsTM), покрытых биотинилированным человеческим KLK5 и конъюгатом FITC козьего антитела против кроличьего Fc-фрагмент (Jackson ImmunoResearchTM). 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 EppendorfTM 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 (VH) или каппа-цепь (VL) IgG кролика. Конструкции тяжелой и легкой цепей совместно трансфецировали в клетки ExpiNEK-293 с использованием ExpiFectamineTM (Life TechnologiesTM) и рекомбинантного антитела, экспрессированного в 125-миллилитровой колбе ЭрленмейераTM 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 MabSelectSuRe (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 2М 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 ВЕН200) и на эндотоксин с использованием системы PTS Endosafe.

Из этого анализа кроличьи 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 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 разведений в диапазоне от 600 нМ до 20 пМ, и 5 мкл переносили в черные 384-луночные планшеты для анализа (CorningTM, кат. n.3575) с использованием Beckman Coulter FXTM и системы Multidrop. 15 мкл активного рекомбинантного белка калликреина добавляли в соответствующие лунки для достижения следующих конечных концентраций: 60 пМ Hu KLK5, 250 пМ Hu KLK7, 500 пМ Hu KLK2, 30 пМ Hu KLK4, 30 пМ cyno KLK5, 500 пМ cyno KLK7, 30 пМ мышинового KLK5 или 10 нМ мышинового KLK7 в буфере для анализа А (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 200 мкМ EDTA, 0,05% (об./об.) Tween-20, pH 7,6). В качестве контроля в лунки добавляли 20 мкл аналитического буфера А для 0% активности, в качестве положительного контроля для ингибирования использовали LEKTI D5 Fc кролика в том же диапазоне концентраций антител, а 15 мкл человеческого KLK5 в 5 мкл аналитического буфера А использовали 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 BiochemicalsTM) для KLK5 человека (300 мкМ), KLK2 человека (30 мкМ), KLK5 мыши (300 мкМ) и KLK5 яванского макака. (450 мкМ); KHLF-AMC (Cambridge Research BiochemicalsTM) для KLK7 человека и яванского макака (90 мкМ и 150 мкМ, соответственно), PFR-AMC (R&D SystemsTM) для KLK4 человека (200 мкМ) и Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH₂ (R&D SystemsTM) для мышинового KLK7 (150 мкМ). Образцы инкубировали в течение 4 часов и считывали на планшет-ридеере Pherastar FSX (BMG LabtechTM) при λ_{ex} 380 нм и λ_{em} 430 нм для Boc-VPR-AMC, PFR-AMC и KHLF-AMC и при λ_{ex} 320 нм и λ_{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 ScreenerTM).

В дополнение к кроличьему антителу 10236, для этого измерения, полинуклеотидные последовательности кроличьих вариабельных областей антител 10236 и 10273 были клонированы на модифицированной версии мышинового вектора СКарра,

содержащей мутацию S171C, для воссоздания дополнительной дисульфидной связи, обнаруженной в кроличьих легких цепях VK, отсутствующей в константных областях мыши (SEQ ID NO: 155 и 156 для кроличьего антитела 10273 mIgG и SEQ ID NO: 159 и 160 для кроличьего антитела 10236 mIgG). В результате были получены антитела, содержащие SEQ ID NO: 157 и 158 для кроличьего антитела 10236 mIgG и SEQ ID NO: 153 и 154 для кроличьего антитела 10273 mIgG.

Кроличьи антитела 10236 и 10273 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 членами семейства человека (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 LEKTI D5 Fc кролика представлены в Таблице 2.

Таблица 2

	Hu KLK5	Hu KLK2	Hu KLK4	Hu KLK7	Cy KLK5	Cy KLK7	Mu KLK5	MuKL K7
Антитело	IC₅₀ (M)							
10236 mIgG	2.40E-10	NI	NI	NI	3,30E-11	NI	NI	NI
10236 IgG кролика	1.74E-10	NI	NI	NI	2,76E-11	NI	NI	NI
10273 mIgG	3.48E-11	NI	NI	NI	3,01E-10	NI	NI	NI
LEKTI D5 Fc	1.03E-10	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

NI=нет ингибирования; Hu=человек; Cy=суно; Mu=мышь; n/a=недоступно

Пример 5: Определение аффинности KLK5-специфических антител

Кинетику связывания мышиных молекул IgG с человеческим KLK5 оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore T200) при 25°C.

Специфическое козье антитело против мышинового Fc IgG (Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с помощью химического связывания с аминокислотной группой 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-кратных серийных разведения) в рабочем буфере HBS-EP+ (GE Healthcare), дополненном NaCl до конечной концентрации 300 mM. Ввод пустой пробы буфера был включен, чтобы вычесть 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

кролик/мышь антитела	ka (Mc ⁻¹)	kd (с ⁻¹)	KD (pM)
10236	3,00E+06	5,17E-04	172,3
10273	1,14E+06	1,84E-04	160

Пример 6: Характеристика антитела 10273

KLK5-PAR2 клеточный анализ кроличьего антитела 10273

Было показано, что KLK5 активирует рецепторы активируемого протеазой рецептора-2 (PAR2) на поверхности кератиноцитов (K. Oikonomopoulou et al. Kallikrein-mediated cell signalling: 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 рекомбинантного KLK5 контролировали путем обнаружения IP1 с использованием набора для анализа от Cisbio.

Конфлюэнтные клетки HaCat собирали и высевали на планшет 384 Fluoblock (CorningTM) по 10000 клеток/лунку и культивировали в среде DMEM+10% FBS+2 mM L-глутамина+Pen/Strep (Life TechnologiesTM) при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи, после чего их обрабатывали в соответствии с протоколом анализа IP-One Gq (CisbioTM). Тестируемые антитела серийно разбавляли в 1х стимулирующем буфере В (набор для анализа IP-One Gq, CisbioTM) с максимальной концентрацией 2 мкМ и инкубировали в течение 1 часа при 37°C в присутствии 200 нМ человеческого рекомбинантного KLK5. Смесь антител/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 10273 было способно почти полностью ингибировать высвобождение IP1 из клеток HaCat, обработанных KLK5 (Фигура 1), демонстрируя аналогичное максимальное ингибирование высвобождения IP1, но проявляя большую эффективность по сравнению с белком LEKTI.

Механизм действия антитела 10273

Неконкурентные ингибиторы ферментов снижают активность фермента, но способны одинаково хорошо связывать фермент в присутствии субстрата или в его отсутствие. И ингибитор, и субстрат способны связывать фермент одновременно, но продукт расщепления 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 10273 или белок LEKTI-D5 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 IC₅₀ для KLK5 (см. выше). 10 мкл антител добавляли в 384-луночный аналитический планшет Corning с низким связыванием и низким фланцем (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 (Вос-VPR-AMC < 1 мМ), либо 180 пМ KLK5 (Вос-VPR-AMC > 1 мМ) и контроля флуоресценции (λ_{ex}380 нм λ_{em}430 нм) каждые 30 секунд. Конечные реакционные условия содержали антитело 10273 или белок LEKTI-D5 Fc с IC₅₀ в 100, 10 или 1 раз больше, чем для KLK5, определенной (как описано выше), серийное разведение Вос-VPR-AMC от 10 мМ до 100 мкМ и либо 60 или 600 пМ KLK5. Отрицательные контроли готовили путем замены антитела или KLK5 буфером для анализа.

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} были нанесены на график в зависимости от концентрации субстрата, чтобы определить механизм ингибирования (Фигура 2).

Скорость ингибирования KLK5 антителом 10273 не изменилась при увеличении концентрации субстрата, что свидетельствует о том, что антитело 10273 является неконкурентным ингибитором KLK5 (Фигура 2А). Белок LEKTI-D5 Fc демонстрирует снижение скорости ингибирования с увеличением концентрации субстрата, демонстрируя конкурентный механизм действия (Фигура 2В).

Связывание LEKTI с KLK5 в присутствии антитела 10273

Были проведены эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом (SPR), чтобы определить, конкурирует ли антитело 10273 с белком LEKTI D5 за связывание с KLK5 человека. Эти анализы позволили сравнить аффинность слитого белка LEKTI D5 Fab для белка KLK5 индивидуально с человеческим KLK5 в комплексе с антителом 10273.

Кинетические измерения связывания слитого белка LEKTI D5 Fab с человеческим KLK5 проводили с использованием Biacore T200 (GE Life Sciences™). Для подготовки поверхности чипы CM5 (GE Life Sciences™) сначала активировали 5-минутной инъекцией (30 мкл мин⁻¹) смеси EDC/NHS (GE Life Sciences™), а затем инъекцией 100 мкг мл⁻¹ слитого белка LEKTI D5 Fab (UCB) в ацетатном буфере, pH 5 (GE Life Sciences™) 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 KLK5 человека от 0,32 до 32 нМ в буфере HBS-EP (GE Life SciencesTM) в режиме кинетики одиночного цикла. Значения, полученные для инъекций только буфера, вычитали из значений, полученных для инъекций KLK5, и кинетику определяли путем аппроксимации к модели связывания 1:1 в программном обеспечении оценки BIAcore (GE Life SciencesTM).

Чтобы определить, был ли человеческий LEKTI способен связывать человеческий KLK5, когда человеческий KLK5 связывался с кроличьим антителом 10273, поверхности для захвата антител готовили с использованием поликлонального козьего антитела против кроличьего Fc и Ab 10273, захваченного, как описано в Примере 4. Затем вводили 20 нМ человеческого KLK5 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 BiacoreTM Evaluation (GE Life SciencesTM).

Для сравнения, слитый белок LEKTI D5 Fab иммобилизовали на поверхности чипа перед мониторингом взаимодействия с человеческим KLK5. Слитый белок LEKTI D5 Fab человека был способен связываться с человеческим KLK5 с аффинностью 19,7 нМ, когда человеческий KLK5 уже находился в комплексе с кроличьим антителом 10273 (таблица 4). В то время как аффинность человеческого LEKTI к человеческому KLK5 в отсутствие кроличьего антитела 10273 выше (40 пМ), этот анализ демонстрирует, что, связывая человеческий KLK5 в присутствии или в отсутствие человеческого LEKTI, кроличье антитело 10273 может обеспечивать дополнительную ингибирующую активность в отношении человеческого KLK5.

Таблица 4

	ka (M⁻¹s⁻¹)	kd (s⁻¹)	KD (M)
KLK5 человека индивидуально	5,70E+05	2,30E-05	4,00E-11
10273+KLK5 человека	2,87E+04	5,65E-04	1,34E-08*

* среднее значение n=2

Образование комплекса LEKTI-KLK5-антитело 10273

KLK5 продуцировали 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 Ni²⁺. Фракции из колонки Ni²⁺, содержащие KLK5, объединяли и расщепляли протеазой TEV для удаления His-метки, затем проводили вторую стадию аффинной хроматографии Ni для удаления протеазы TEV, позволяя расщепленному KLK5 проходить через колонку. Фракцию, проходящую через вторую колонку Ni²⁺, 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 TEV) в соответствии с SEQ ID NO: 173 и домен 8 LEKTI (LEKTID8 Fc TEV) в соответствии с SEQ ID NO: 174 продуцировали в клетках HEK293 в виде секретируемых белков с С-концевой отщепляемой 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 10273 экспрессировали в клетках HEK293 в виде секретируемого белка. Экспрессионные конструкции, содержащие SEQ ID NO: 166 и 168, совместно трансфицировали в молярном соотношении 1:1. Секретируемый Fab (содержащий SEQ ID NO: 165 и 167) 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 10273 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 10273 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 3А и 3В показаны хроматограммы SEC только человеческого KLK5 (сплошная линия, крайний справа), отдельно кроличьего Fab-антитела 10273 (пунктирная линия), бинарного комплекса KLK+LEKTID5 или D8 человека (Фигура 3А или 3В, соответственно, длинная черточка), и тройной комплекс KLK5+LEKTID5 или D8+кроличье Fab-антитело 10273 (Фигура 3А или 3В, соответственно, короткая черта слева).

Молекулярная масса (MW) компонентов каждого пика была подтверждена с помощью SDS PAGE, как показано на Фигурах 4А и 4В.

Комплексы между KLK5, LEKTID5 или LEKTID8 и кроличьим Fab-антителом 10273 легко образуются при смешивании в соотношении 1:1:1 путем смешивания человеческого KLK5 с каждым LEKTI-фрагментом по отдельности с последующим инкубированием бинарных комплексов с кроличьим Fab-антителом 10273. 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 10273/Fab-антитело 10236

Для кристаллографических исследований человеческий KLK5 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: 142 или SEQ ID NO: 144) в супернатанте. Клетки собирали через 5 дней после трансфекции и супернатанты сразу же использовали для очистки. Супернатанты, содержащие KLK5 человека, разбавляли в 4 раза буфером А (50 мМ Tris, pH 7,0, 50 мМ NaCl) и загружали в катионообменную колонку HiTrap SP HP. Связанные белки элюировали градиентом буфера В (50 мМ Tris, pH 7, 1 М NaCl) в 10 объемах колонки. Фракции, содержащие очищенный KLK5 человека, объединяли, концентрировали и дополнительно очищали эксклюзионной хроматографией на S200 26/60, которую уравнивали 20 мМ Tris, 150 мМ NaCl при pH 7,2. KLK5 был охарактеризован с помощью SDS-PAGE и мигрировал в положение на геле, соответствующее ожидаемой молекулярной массе (MW) гликозилированного белка с высоким содержанием маннозы ~ 35-38 кДа.

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 человеческий KLK5 был доступен для кристаллографических исследований. KLK5 был охарактеризован с помощью SDS-PAGE (фиг. 5) и мигрировал в положение на геле, соответствующее ожидаемой молекулярной массе (MW) дегликозилированного белка ~ 25 кДа.

Кроличье Fab-антитело 10273 экспрессировали, как описано в примере 6. Кроличье Fab-антитело 10236 (содержащее SEQ ID NO: 181 и 183) экспрессировали, как описано для кроличьего Fab-антитела 10273. Короче говоря, экспрессирующие конструкции, содержащие SEQ ID NO: 182 и 184, котрансфицировали при молярном соотношении 1:1. Каждый из секретируемых Fab-белков очищали пропусканием 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 повторно диализовали в PBS, pH 7,2, 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 мМ Tris, 150 мМ NaCl, буфер для элюирования pH 7,2). Единственный пик, содержащий комплекс, перед кристаллизацией концентрировали до ~10,8 мг/мл.

Условия кристаллизации комплекса человеческого KLK5/кроличьего Fab-антитела 10273/кроличьего Fab-антитела 10236 определяли с использованием нескольких имеющихся в продаже ячеек для кристаллизации. Анализы 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 раствора кристаллизации в ячейках с использованием системы обработки жидкостей Microlab STAR (Hamilton). Затем 300 нл комплекса человеческого KLK5/кроличьего Fab-антитела 10273/кроличьего Fab-антитела 10236 и 300 нл растворов емкости вносили в лунки планшетов для кристаллизации с помощью устройства обработки жидкости Mosquito (TTP LabTech). Монокристалл получали в условиях 16 (лунка B4) MIDAS+ HT-96 ячейка (Molecular Dimensions, кат. No. MD1-107). Это условие содержит 45% об./об. пропоксилата пентаэритрита (5/4), 0,2 М NaCl и 0,1 М 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. D* 66, 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 человеческого KLK5/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 структуру 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. *J Mol Biol.* 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 человеческого KLK5/кроличьего Fab-антитела 10273/кроличьего Fab-антитела 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 химотрипсина в скобках. В таблице 5 показана статистика усовершенствования на момент первого описания изобретения.

Таблица 5

Совокупность данных	
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 _{merge} (%)	4,10 (52,9)
R _{meas} (%)	5,70 (72,4)
R _{pim}	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 ²)	62,535
Уточнение статистики	
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 В-фактор (Å ²)	69,33

Эпитоп KLK5 человека, связанный кроличьим Fab-антителом 10273 при контактном расстоянии 4 Å, состоит из остатков Leu212 (163), Ser213 (164), Gln214 (165), Lys215 (166), Arg216 (167), Glu218 (169), Asp219 (170), Ala220 (171), Pro222 (173), Gly233 (184), Pro269 (223), Asn270 (224) и Pro272 (226) со ссылкой на SEQ ID NO: 142, при этом номера в скобках соответствуют номенклатуре протеаз. Сайт связывания показан более подробно на Фигуре 6.

Другие аминокислотные остатки вблизи эпитопа, но на расстоянии 5 Å от контакта между человеческим KLK5 и кроличьим Fab-антителом 10273, включают Ala181 (132),

Val211 (162), Tyr221 (172), Asp234 (185) и Arg271 (225) применительно к SEQ. ID NO: 142, тогда как числа в скобках соответствуют номенклатуре протеаз. Как показано на Фигуре 7, антитела 10236 и 10273 имеют очень разные, неперекрывающиеся сайты связывания и связываются с разными эпитопами на KLK5 человека.

Пример 8: Гуманизация и характеристика антитела 10273

Гуманизация Ab 10273

Кроличье антитело 10273 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 8 и 9 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 10273 в качестве акцептора для CDR легкой цепи была выбрана человеческая V-область IGKV1D-13 плюс J-область JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>). Каркасные остатки в гуманизированном трансплантате легкой цепи gL2 все взяты из гена зародышевой линии человека (Фигура 8).

Человеческая V-область IGHV3-66 плюс J-область JH6 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) была выбрана в качестве акцептора для CDR тяжелой цепи антитела 10273. Как и во многих кроличьих антителах, ген VH антитела 10273 короче, чем выбранный человеческий акцептор. При выравнивании с акцепторной последовательностью человека в каркасной области 1 области VH антитела 10273 отсутствует N-концевой остаток, который сохраняется в гуманизированном антителе (Фигура 9). Каркас 3 области VH кролика 10273 также лишен двух остатков (75 и 76) в петле между нитями бета-листа D и E: в гуманизированных трансплантатах пробел заполнен соответствующими остатками (лизин 75, K75; аспарагин 76, N76) из выбранной акцепторной последовательности человека (Фигура 9). Все каркасные остатки в гуманизированных трансплантатах тяжелой цепи 10273 происходят из гена зародышевой линии человека, за исключением одного или более остатков из группы, включающей остатки 24, 48, 49, 71, 73 и 78, где были сохранены, соответственно, донорные остатки валина (V24), изолейцина (I48), глицина (G49), лизина (K71), серина (S73) или валина (V78). Сохранение остатка G49 необходимо для полной эффективности гуманизированного антитела. Потенциальный сайт гидролиза в CDRH3 был модифицирован в трансплантате gH3 путем замены остатка аспарагиновой кислоты в положении 116 на глутаминовую кислоту (D116E).

pI гуманизированных антител 10273 составляет ~6,2. Чтобы облегчить удаление примесей с помощью ионообменной хроматографии во время последующей обработки, pI повышали путем мутации остатка 1 в CDRL1 применительно к SEQ ID NO: 1 трансплантата gL2 от глутамина (Q) до аргинина (R), остаток лизина (K) или гистидина (H). Кроме того, остаток 19 в CDRH3 (применительно к SEQ ID NO: 6) был заменен остатком аспарагиновой кислоты (D) на остаток аспарагина (N) для дальнейшего увеличения pI: неожиданно мутация в CDRH3 (D19N) также придавала повышенную аффинность к KLK5.

В трансплантированном антителе 10273 gL2-Q24RgH1-D116N CDR-H3 содержит 6 остатков тирозина. Были получены мутанты этого трансплантата с заменой отдельных остатков тирозина на остаток фенилаланина для получения трансплантатов 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y4F, 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y6F, 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y9F, 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y12F, 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y15F, 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y16F. Дополнительные мутанты были получены путем мутации треонина, находящегося перед двойным тирозином в положениях 15 и 16, применительно к SEQ ID NO: 6, что привело к получению трансплантатов 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14V и 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14S.

Кинетику связывания этих трансплантатов с человеческим KLK5 оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore T200) при 25°C.

Специфическое козье антитело против человеческого IgG Fc (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 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 0,74 нМ (3×3-кратных серийных разведения) в рабочем буфере HBS-EP+ (GE Healthcare), дополненном NaCl, до конечной концентрации 300 mM. Ввод пустой пробы буфера был включен, чтобы вычесть фон прибора и смещение показаний.

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

Таблица 6 показывает, что не все мутации приводят к тому, что антитело все еще способно связывать KLK5 с аффинностью, сходной или близкой к исходному антителу или трансплантату антитела, из которого они были получены.

Таблица 6

Дескриптор	ka(1/Mc)	kd(1/c)	KD(nM)
10273 gL2gH1	5,14E+05	8,45E-05	164,3

10273gL2-Q1RgH1-D19N	4,27E+05	1,75E-04	410,2*
10273gL2-Q1RgH1-D19N	2,57E+05	1,33E-04	309,1*
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y6F	2,98E+05	1,86E-04	625,4
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y9F	3,62E+05	2,00E-04	553,9
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y12F	4,32E+05	1,38E-04	318,5
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y15F	5,58E+05	1,39E-04	249,1
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14S	2,57E+05	1,65E-04	643,8
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y4F	4,51E+05	5,19E-04	1151,6
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y16F	2,77E+05	1,60E-03	5768,6
10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14V	3,64E+05	2,51E-03	6898,4

* Дублированные образцы, одинаковые условия анализа, запуск в начале и в конце эксперимента. Различные значения находятся в пределах ожидаемой изменчивости эксперимента.

Профилирование гуманизированных антител

Селективность KLK5

Была проведена серия исследований, чтобы гарантировать, что гуманизация кроличьего антитела 10273 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™, 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 для достижения следующих конечных концентраций анализа: 60 пМ KLK5 человека (UCB), 250 пМ KLK7 (UCB), 500 пМ KLK2 (R&D), 30 пМ KLK4 (UCB), а также 30 пМ рекомбинантного KLK5 яванского макака (UCB), 500 пМ KLK7 яванского макака, 30 пМ мышинового KLK5 (UCB) и 5 нМ мышинового KLK7 (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 ингибирующей активности; Поэтому 5 мкл LEKTI D5 Fc кролика в том же диапазоне концентраций, что и для антитела 10236, добавляли к 15 мкл ферментов калликреина. 15 мкл человеческого KLK5, 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 BiochemicalsTM) для KLK5 человека (300 мкМ), KLK2 человека (30 мкМ), KLK5 мыши (300 мкМ) и KLK5 яванского макака (450 мкМ); KHLF-AMC (Cambridge Research BiochemicalsTM) для KLK7 человека и яванского макака (90 мкМ и 150 мкМ, соответственно), PFR-AMC (R&D SystemsTM) для KLK4 человека (200 мкМ) и Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH₂ (R&D SystemsTM) для KLK7 мыши (150 мкМ). Образцы инкубировали в течение 4 часов и считывали на планшет-ридере Pherastar FSX (BMG LabtechTM) при λ_{ex} 380 нм и λ_{em} 430 нм для Boc-VPR-AMC, PFR-AMC и KHLF-AMC и при λ_{ex} 320 нм и λ_{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 ScreenerTM).

Гуманизированные трансплантаты Ab 10273 сохраняли специфичность в отношении KLK5 и демонстрировали незначительное ингибирование или отсутствие ингибирования других протестированных членов семейства KLK (данные не представлены).

Уровень ингибирования KLK5 гуманизированными трансплантатами

Анализ захвата был разработан для определения уровня ингибирования активности KLK5, опосредованного гуманизированными вариантами трансплантата Ab 273.

На черные 384-луночные планшеты Nunc Maxisorp (Sigma AldrichTM) наносили покрытие в виде F(ab')₂-фрагмента козьего антитела против Fcγ-фрагмента IgG человека (Jackson ImmunoResearchTM) в концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере покрытия и оставляли на ночь при 4°C. Планшеты промывали 3 раза на устройстве для промывки планшетов BiotekTM с PBS и 0,005% Tween-20, и планшеты блокировали 20 мкл/лунку PBS с 1% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали, как описано выше, и в соответствующие лунки добавляли 10 мкл 5 нМ антитела (разбавленного из исходного раствора с использованием буфера для анализа: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 200 мкМ EDTA, 0,005% (об./об.) Tween-20, pH 7,6). Планшеты запечатывали и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре перед промывкой. Затем в соответствующие лунки добавляли 10 мкл 250 pM KLK5 (разбавленного из исходного раствора в буфере для анализа), инкубировали при комнатной температуре в течение четырех часов перед добавлением 10 мкл 600 mM субстрата BVPR-AMC. Антитело удаляли и заменяли буфером для анализа в лунки с контролем «максимальной активности», в то время как в лунки с контролем «минимальной активности» не добавляли ни субстрата, ни фермента (заменяли буфером для анализа). Флуоресценцию (λ_{ex} 380 нм λ_{em} 430 нм) считывали каждый час в течение четырех часов, используя планшет-ридер PheraStarFSX.

Данные анализировали для получения процентного ингибирования значений KLK5. Каждое значение времени 0 было вычтено из его эквивалентного значения времени 4 часа, чтобы получить нормализованный набор данных с поправкой на исходный уровень. Для преобразования нормированных значений флуоресценции в %

ингибирования использовали следующую формулу:

$$\% \text{Ингибирования} = 100 \times (1 - (\text{тест} - \text{мин.}) / (\text{макс.} - \text{мин.}))$$

Мин.=минимальное значение активности; Макс.=максимальное значение активности

Данные были построены для создания гистограмм, показанных на Фигуре 10. Значения процента ингибирования находились в диапазоне от 95% до 97%, демонстрируя, что трансплантаты антитела 10273 были способны почти полностью ингибировать активность фермента KLK5.

Пример 9: Биофизическая характеристика гуманизированных антител

Характеристика антител с помощью масс-спектрометрии

Идентичность каждого антитела была подтверждена измерением интактной массы тяжелых и легких цепей с помощью ЖХ-МС с использованием системы УЭЖХ Waters ACQUITY с масс-спектрометром Xevo G2 Q-ToF. Образцы (~5 мкг) восстанавливали в 5 мМ Tris(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) в 150 мМ ацетата аммония при 37°C в течение 40 минут. ЖХ-колонка представляет собой колонку Waters BioResolveT RP mAbPolyphenyl, 450 Å, 2,7 мкм, выдержанную при 80°C, уравновешенную 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 уравниванием. УФ-данные получали при 280 нм. Условия МС 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.

Интактная масса (уменьшенные цепи) показала, что наблюдаемая масса легкой цепи соответствовала ожидаемой массе. Однако наблюдалась разница в +80 дальтон между наблюдаемой и ожидаемой массой тяжелой цепи для всех 10273 молекул, за исключением 10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y9F (таблица 7).

Было установлено, что это посттрансляционная модификация Туг 9 в тяжелой цепи, и было подтверждено, что это сульфатирование с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела против сульфотирозина. Кроме того, инкубация 10273 gL2-Q1RgH1-D19N с сульфатазой морского ушка при 37°C в течение 1 часа снижала долю модификации +80 Да примерно на 17% по данным интактной масс-спектрометрии.

Таблица 7

Описание образца		Легкая цепь (Да)			Тяжелая цепь (Да)			% + 80 Да
		Exp	Obs	Δ	Exp	Obs	Δ	
hI gG 4P	10273gL2gH1	23707,2	23709,0	1,8	51260,2	51343,6	83,4	95%
	10273gL2-Q1RgH1-D19N	23735,2	23737,0	1,8	51259,2	51342,2	83,0	80%
	10273gL2-Q1RgH4-D19N	23735,2	23734,8	-0,4	51231,2	51316,0	84,8	100%

	gH13							
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y4F	23735,3	23737,8	2,5	51243,2	51327,8	84,6	85%
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y6F	23735,3	23737,8	2,5	51243,2	51327,8	84,6	75%
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y9F	23735,3	23737,8	2,5	51243,2	51247,8	4,6	0%
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y12F	23735,3	23737,8	2,5	51243,2	51327,8	84,6	75%
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y15F	23735,3	23737,8	2,5	51243,2	51328,0	84,8	85%
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y16F	23735,3	23737,8	2,5	51243,2	51327,6	84,4	75%
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14V	23735,3	23737,8	2,5	51257,2	51341,8	84,6	75%
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14S	23735,3	23737,8	2,5	51245,2	51329,4	84,2	65%
hI gG 1	10273gL2gH1	23707,2	23706,2	-1,0	51417,4	51497,2	79,8	70%

Exp.=Ожидается; Obs=Наблюдается; Δ=Дельта

Измерения термостабильности (Tm)

Температуру плавления (Tm) или температуру в середине разворачивания определяли с помощью анализа ThermoFluor.

Для анализа ThermoFluor флуоресцентный краситель SYPRO® оранжевый использовался для мониторинга процесса разворачивания белка путем связывания с гидрофобными областями, которые экспонированы при повышении температуры. Реакционная смесь содержала 5 мкл 30х раствора SYPRO® Orange Protein Gel Stain (ThermoFisher Scientific, S6651), разбавленного из 5000х концентрата тестовым буфером. 45 мкл образца 10273 Ab в концентрации 0,2 мг/мл в PBS pH 7,4 добавляли к красителю и перемешивали. 10 мкл этого раствора распределяли в четырех экземплярах в 384-луночном планшете для ПЦР с оптическими лунками и анализировали 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 (Tm).

Для всех антител наблюдали два перехода разворачивания. Первый можно отнести

к домену CH2, а второй можно отнести к среднему показателю Tm домена разворачивания Fab и домена CH3.

Не было различий в термостабильности между антителами 10273 IgG4P (Таблица 8). Увеличение термостабильности наблюдали для формата IgG1 антитела 10273 gL2gH1 по сравнению с соответствующим форматом IgG4P, как и ожидалось. (Heads et al «Relative stabilities of IgG1 and IgG4 Fab domains: influence of the light-heavy interchain disulfide bond architecture». Protein Sci 2012; 21:1315-22).

Таблица 8.

Дескриптор		Tm(°C)			
		Fab домен	SD	CH2 домен	SD
hIgG4P	10273gL2gH1	75,1	0,1	66,3	0,2
	10273gL2-Q1RgH1-D19N	75,2	0,1	66,4	0,1
	10273gL2-Q1RgH4-D19N	75,1	0,2	66,5	0,2
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y4F	75,7	0,1	66,6	0,2
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y6F	75,8	0,2	66,4	0,2
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y9F	75,6	0,1	66,6	0,1
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y12F	75,5	0,1	66,7	0,2
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y15F	75,5	0,1	66,5	0,2
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-Y16F	75,4	0,2	66,4	0,2
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14V	75,5	0,3	66,7	0,1
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N-T14S	75,3	0,2	66,3	0,3
hIgG1	10273gL2gH1	80,2	0,1	69,9	0,1

Дальнейшую биофизическую характеристику выполняли на трех гуманизированных антителах IgG4P, антителах 10273 gL2H1, gL2Q1R-gH1D19N и gL2Q1R-gH4D19N, и одном в формате IgG1, на антителе 10273 gL2gH1.

Экспериментальное измерение изоэлектрической точки (pI)

Для экспериментального определения pI использовали систему капиллярной изоэлектрической фокусировки iCE3™ с визуализацией всего капилляра (cIEF) (ProteinSimple). Образцы 10273 Ab 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 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).

Более высокая pI наблюдалась как следствие мутаций в легкой цепи Q1R и тяжелой цепи D19N. Разница в изоэлектрическом типе, то есть IgG1 вместо IgG4P, также приводила к увеличению

экспериментальной pI. Как мутации, так и изменение изотипа можно использовать во время производства для удаления белков клетки-хозяина на первой стадии ионного обмена (АЕХ). Увеличенная pI также позволяет приготовление состава в более распространенных буферах (рН примерно от 5 до 6).

Таблица 9.

Дескриптор		pI
IgG4P	10273 gL2gH1	6,2
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N	6,6
	10273 gL2-Q1RgH4-D19N	6,6
IgG1	10273 gL2gH1	7,3

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 кажущейся гидрофобности.

Образцы 10273 Ab в концентрации 2 мг/мл разбавляли 1:2 1,6 М сульфатом аммония и PBS (рН 7,4). 10 мкг (10 мкл) образца вводили в колонку Dionex ProPac™ HIC-10 (100 мм x 4,6 мм), соединенную 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 мМ фосфат, рН 7,4) и буфер В (100 мМ фосфат, рН 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 10.

Таблица 10.

Дескриптор		Время удерживания основного пика (мин)
IgG4P	10273 gL2gH1	16,3
	10273 gL2-Q1R gH1-D19N	17,4
	10273 gL2-Q1R gH4-D19N	19,8
IgG1	10273 gL2gH1	15,1

Между различными антителами 10273 наблюдались лишь небольшие различия во времени удерживания, то есть кажущейся гидрофобности, и считалось, что все они

демонстрируют измерения, превышающие средние значения, следовательно, потенциально проявляли склонность к агрегации (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). Таким образом, все молекулы проявляли большую склонность связываться с матрицей НИС. Матрица НИС использовалась в качестве альтернативы ионному обмену в производстве.

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 (масс./об.) 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) (масс./об.) готовили в PBS, pH 7,4; 50 mM ацетата натрия, 125 mM хлорида натрия, pH 5 (обычные буферы для хранения) и 50 mM гистидина, 250 mM пролина, pH 5,5 (обычный буфер для приготовления состава). Серийное титрование выполняли с помощью вспомогательного робота для работы с жидкостью (Integra, 4505), что дало диапазон от 40% до 15,4% ПЭГ 3350. Чтобы свести к минимуму неравновесное осаждение, подготовка образцов заключалась в смешивании образцов 10273 Ab и растворов 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 10273 Ab с концентрацией 2 мг/мл добавляли к исходным растворам ПЭГ, получая тестовую концентрацию 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®, половина площади, 96-луночный, µClear®, микропланшет (Greiner, 675801). Концентрации белка определяли с помощью УФ-спектрофотометрии при 280 нм с использованием многофункционального микропланшет-ридера FLUOstar®Omega (BMG LABTECH). Полученные значения наносили на график с использованием Graphpad prism version 7.04, показатель средней точки ПЭГ (PEGmdpnt) получали из средней точки сигмоидальной зависимости доза-реакция (переменный наклон).

Данные представлены в Таблице 11, где более высокая средняя точка ПЭГ (%) соответствует большей вероятности стабильности/растворимости при высокой концентрации.

При pH 7,4 10273 gL2gH1 (IgG4P) демонстрируют самую высокую среднюю точку ПЭГ (наибольшая прогнозируемая растворимость), однако демонстрируют самую низкую растворимость в ацетате при pH 5. Эта тенденция отличалась от соответствующей

молекулы IgG1, где не было различий в прогнозируемой растворимости между PBS pH 7,4 и ацетатом pH 5. Как 10273gL2-Q1RgH1-D19N, так и 10273 gL2-Q1RgH4-D19N показали сходную среднюю точку ПЭГ в PBS с pH 7,4 и гистидиновом буфере с pH 5,5, однако наблюдалось снижение в ацетатном буфере с pH 5.

Таблица 11

Дескриптор		PEG средняя точка		
		pH 7,4 PBS	pH 5 ацетат	pH 5,5 Гистидин/Пролин
IgG4P	10273 gL2gH1	11,7	8,3	9,7
	10273 gL2-Q1RgH1-D19N	10,5	9,1	10,1
	10273 gL2-Q1RgH4-D19N	10,4	9,5	10,5
IgG1	10273 gL2gH1	10,7	10,4	Не делали

Эффект стресса на границе раздела воздух-жидкость (анализ агрегации)

Белки имеют тенденцию разворачиваться при экспонировании с границей раздела воздух-жидкость, где гидрофобные поверхности представлены гидрофобной среде (воздуху), а гидрофильные поверхности - гидрофильной среде (воде). Встряхивание белковых растворов обеспечивает большую поверхность раздела воздух-жидкость, которая может стимулировать агрегацию. Этот анализ служит для имитации стрессов, которым молекула будет подвергаться во время производства (например, ультрафильтрация), и для обеспечения жестких условий, чтобы попытаться различить разные молекулы антител.

Образцы в PBS, pH 7,4 или 50 mM ацетата натрия и 125 м хлорида натрия, pH 5 подвергали воздействию вортекса с использованием Eppendorf Thermomixer Comfort™. Перед встряхиванием концентрацию доводили до 1 мг/мл с использованием соответствующих коэффициентов экстинкции (1,46 абс. при 280 нм, 1 мг/мл, длина оптического пути 1 см) и значений поглощения при 280, 340 и 595 нм, полученных с использованием спектрофотометра Varian Cary 50-Bio. ®, чтобы установить нулевое отсчет времени. Каждый образец разбивали на аликвоты в конические пробирки Eppendorf® с крышками объемом 1,5 мл (3×250 мкл) и подвергали встряхиванию при 1400 об/мин при 25°C в течение 4 часов. Агрегацию (мутность) контролировали путем измерения образцов при 595 нм с использованием спектрофотометра Varian Cary® 50-Bio.

Склонность к агрегации через 4 часа в двух буферах для разных антител показана в Таблице 12 и на Фигуре 11.

Таблица 12.

Дескриптор		PBS pH 7,4		Ac/NaCl pH 5	
		Среднее поглощение 595нм/4ч	SD	Среднее поглощение 595нм/4ч	SD
IgG4P	10273 gL2gH1	0,14	0,02	0,49	0,02
	10273 gL2-Q1gH1-D19N	0,35	0,03	0,60	0,04
	10273 gL2-Q1RgH4-D19N	0,44	0,04	1,11	0,10

IgG1	10273 gL2gH1	0,02	0,00	0,01	0,00
------	--------------	------	------	------	------

IgG1 10273gL2gH1 продемонстрировал наибольшую агрегационную стабильность в обоих буферах, и в целом все антитела 10273 были более агрегационно стабильными в PBS с pH 7,4.

Химическая денатурация (разворачивание) с использованием гидрохлорида гуанидина, разворачивание по круговому дихроизму (CD)

Антитела подвергали разворачиванию с использованием химического денатуранта (гидрохлорид гуанидина) в качестве теста на устойчивость.

Гуанидин HCl титровали от 0 до 4 М в более чем 48 лунках в 96-луночном планшете с использованием DragonFly® (TTP labtech, Кембридж, Великобритания) и добавляли образец в концентрации 7,5 мкМ (конечная) в общем объеме 80 мкл перед уравниванием в течение ночи при комнатной температуре. 70 мкл переносили в планшет с глубокими лунками для анализа с помощью автоматического кругового дихроизма (Chiroscan™: ACD, Applied Photophysics, Leatherhead, Великобритания). Измерение кругового дихроизма было получено в дальнем УФ-диапазоне 260-190 нм с использованием шага 0,5 нм с шагом 1 с/момент времени, шириной полосы 1 нм и проточной кюветой с длиной оптического пути 0,2 мм. Сигнал CD на длине волны 210 нм соответствовал сигмодальной кривой отклика на двукратную дозу в Origin 9b.

Тестируемые антитела 10273, по-видимому, имеют сходные профили денатурации в соответствии со средними точками химической денатурации (Cm) (таблица 13) с двумя очевидными переходами, следовательно, продемонстрировали аналогичную устойчивость к химическим денатурантам.

Таблица 13

Дескриптор	Cm1	Cm2
10273 gL2gH1	1,38	2,69
10273 gL2-Q1R gH1-D19N	1,36	2,7
10273 gL2-Q1R) gH4-D19N	1,48	2,76

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

Набор из антител 10273 тестировали в анализе AC-SINS (Liu Y. MAbs.2014 Mar-Apr;6(2):483-92) для оценки склонности к самовзаимодействию и, следовательно, получения информации об устойчивости агрегации.

Козье антитело против Fcγ человека (Jackson ImmunoResearch) заменяли буфером на 20 mM 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 на ночь при комнатной температуре. Конъюгированные наночастицы блокировали 55 мкл ПЭГ-тиола в течение 1 часа, центрифугировали при 21000 g в течение 6 минут, супернатант удаляли и ресуспендировали в 20 mM ацетате натрия, pH 4,3, до конечного объема 150 мкл.

Антитела 10273 разводили до 22 мкг/мл в PBS, pH 7,4 (200 мкл) и добавляли к равному объему неспецифического цельного IgG (Jackson ImmunoResearch), быстро

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 кривым Лоренца (RShiny) и только PBS вычитали из образцов, чтобы получить $\Delta\lambda_{\max}$, как подробно описано в Таблице 14. Чем больше $\Delta\lambda_{\max}$, тем больше склонность к самовзаимодействию. Тестируемые антитела 10273 показали низкие $\lambda_{\max}$ и $\Delta\lambda_{\max}$ (на фоне PBS), что свидетельствует о низкой склонности к самовзаимодействию.

Таблица 14

Дескриптор	$\lambda_{\max}$	$\Delta\lambda_{\max}$
10273 gL2gH1	530,9	1,41
10273 gL2-Q1R gH1-D19N	531,15	1,66
10273 gL2-Q1R gH4-D19N	531,59	2,1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое связывается с калликреином 5 (KLK5), 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 7, или 8, или 9, 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 или любую из SEQ ID NO: 10-29, предпочтительно 10, 11, 13-16, 18, 20, 22-25, 27 или 29.

2. Антитело по п. 1, где:

а. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 10 или 14, или 23.

3. Антитело по п. 1 или 2, где:

а. переменная область легкой цепи содержит CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 7, 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: 23.

4. Антитело по любому из предыдущих пп., где указанное антитело представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

5. Антитело по любому из предыдущих пп., где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

6. Антитело по п. 5, где полноразмерное антитело выбирают из IgG1, IgG4 или IgG4P.

7. Антитело по любому из пп. 1-4, где антитело выбирают из Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dAb или VHH.

8. Антитело по любому из пп. 1-7, где антитело содержит:

а. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 30, или 34, или 38, или 42, или 46; и/или

б. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32 или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 102, или 106, или 110, или 114, или 118, или 122, или 126, или 130, или 134, предпочтительно 32 или 50, или 54, или 58, или 62, или 66, или 70, или 74, или 78, или 82, или 86, или 90, или 94, или 98, или 106, или 110, или 114, или 118, или 126, или 134.

9. Антитело по любому из пп. 1-8, где антитело содержит:

а. переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и/или

б. переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 110.

10. Антитело по любому из пп. 1-6 или 8, или 9, где антитело содержит:
 - а. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 36 или 40, или 44, или 48; и
 - б. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 52 или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 104, или 108, или 112, или 116, или 120, или 124, или 128, или 132, или 136, предпочтительно 52 или 56, или 60, или 64, или 68, или 72, или 76, или 80, или 84, или 88, или 92, или 96, или 100, или 108, или 112, или 116, или 120, или 128, или 136.
11. Антитело по любому из пп. 1-8, где антитело содержит:
 - а. легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 40; и
 - б. тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 112.
12. Антитело по любому из предыдущих пп., где KLK5 представляет собой KLK5 человека, содержащий SEQ ID NO: 142, или 143, или 144, или KLK5 яванского макака, содержащий SEQ ID NO: 151.
13. Антитело по любому из предыдущих пп., которое связывается с калликреином 5 (KLK5), где антитело связывается с эпитопом KLK5 человека, содержащим по меньшей мере один, предпочтительно, по меньшей мере два или более аминокислотных остатков из группы, состоящей из Leu212, Ser213, Gln214, Lys215, Arg216, Glu218, Asp219, Ala220, Pro222, Gly233, Pro269, Asn270 и Pro272 применительно к SEQ ID NO: 142.
14. Антитело по п. 13, где эпитоп охарактеризован с помощью рентгеноструктурного анализа.
15. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело
 - а. ингибирует или снижает протеазную активность KLK5; и/или
 - б. связывается с KLK5, когда KLK5 связан с LEKTI или фрагментом LEKTI; и/или
 - с. не конкурирует с LEKTI или фрагментом LEKTI за связывание KLK5; и/или
 - д. образует комплекс с KLK5, связанным с LEKTI или фрагментом LEKTI.
16. Антитело по п. 15, где фрагмент LEKTI представляет собой домен 5 LEKTI человека, содержащий аминокислоты 1-64 из SEQ ID NO: 145, или домен 8 LEKTI, содержащий аминокислоты 1-71 из SEQ ID NO: 152.
17. Антитело по любому из предыдущих пп., где антитело связывается с KLK5 человека, предпочтительно с KLK5 человека, содержащим SEQ ID NO: 144, и с KLK5 яванского макака, предпочтительно с KLK5 яванского макака, содержащим SEQ ID NO: 151.
18. 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).
19. Антитело, которое конкурирует за связывание KLK5 с антителом по любому из пп.1-18; и
 - а. перекрестно блокирует или перекрестно блокируется антителом по любому из пп. 1-18 для связывания KLK5; или
 - б. связывается с KLK5 с тем же эпитопом, что и антитело по любому из пп.1-18; и

где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 38; и/или содержит переменную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью SEQ ID NO: 110.

20. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп. 1-18.

21. Выделенный полинуклеотид по п. 20, где полинуклеотид кодирует:

a. переменную область легкой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 31, или 35, или 39, или 43, или 47; или

ii. содержит SEQ ID NO: 31 или 35, или 39, или 43, или 47; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 31 или 35, или 39, или 43, или 47; или

b. переменную область тяжелой цепи, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

ii. содержит SEQ ID NO: 33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

iii. состоит по существу, из SEQ ID NO: 33 или 51, или 55, или 59, или 63, или 67, или 71, или 75, или 79, или 83, или 87, или 91, или 95, или 99, или 103, или 107, или 111, или 115, или 119, или 123, или 127, или 131, или 135; или

c. легкую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 37, или 41, или 45, или 49; или

ii. содержит SEQ ID NO: 37 или 41, или 45, или 49; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 37, или 41, или 45, или 49; или

d. тяжелую цепь, где полинуклеотид:

i. по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137; или

ii. содержит SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137; или

iii. состоит по существу из SEQ ID NO: 53 или 57, или 61, или 65, или 69, или 73, или 77, или 81, или 85, или 89, или 93, или 97, или 101, или 105, или 109, или 113, или 117, или 121, или 125, или 129, или 133, или 137.

22. Клонированный или экспрессируемый вектор, содержащий один или более полинуклеотидов по любому из пп. 20 или 21.

23. Клетка-хозяин, содержащая:

a. один или более полинуклеотидов по любому из пп. 20 или 21 или

b. один или более экспрессирующих векторов по п. 22.

24. Способ получения антитела по любому из пп. 1-18, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 23 в условиях, подходящих для получения антитела, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-18 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18 или фармацевтическая композиция по п. 25 для применения в терапии.

27. Антитело по любому из пп. 1-18 или фармацевтическая композиция по п. 25 для применения при лечении заболевания, характеризующегося нарушением регуляции KLK5 или нарушением регуляции ингибирования KLK5.

28. Антитело для применения по п. 27, 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.

29. Антитело для применения по п. 28, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

30. Антитело для применения по п. 28, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

31. 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. 1-18 или фармацевтической композиции по п. 25.

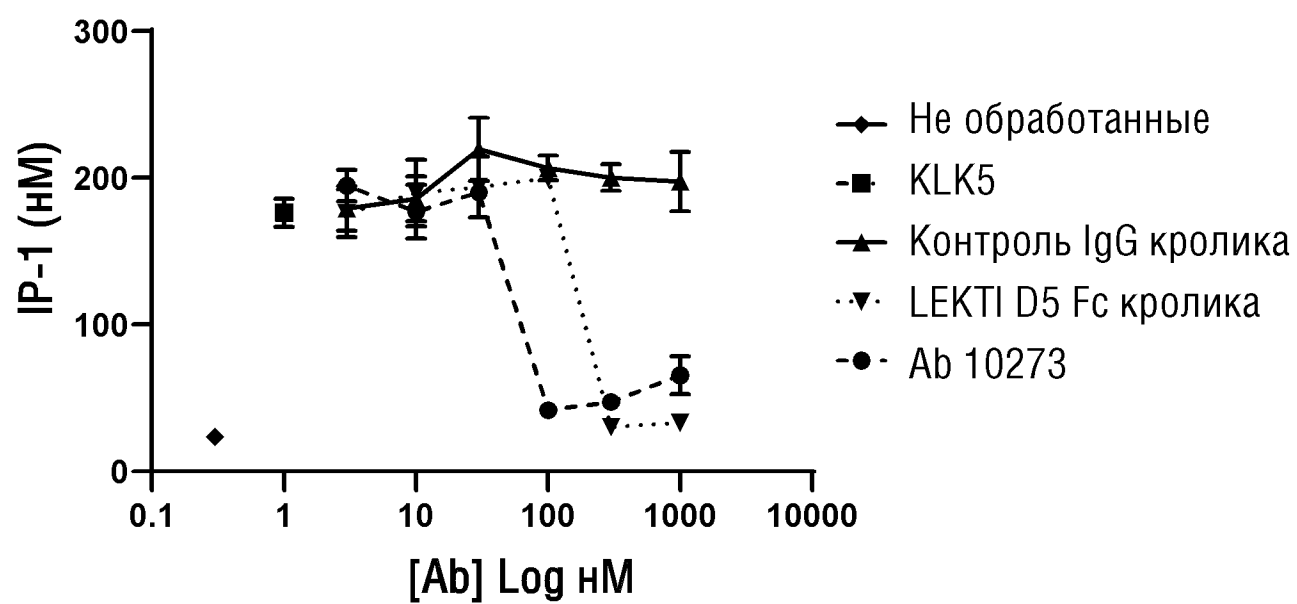
32. Способ по п. 31, где заболевание выбирают из синдрома Нетертона, атопического дерматита, ихтиоза, розацеа, астмы или онкологического заболевания, такого как рак яичников или рак мочевого пузыря.

33. Антитело для применения по п. 32, где заболевание представляет собой синдром Нетертона.

34. Антитело для применения по п. 32, где заболевание представляет собой атопический дерматит.

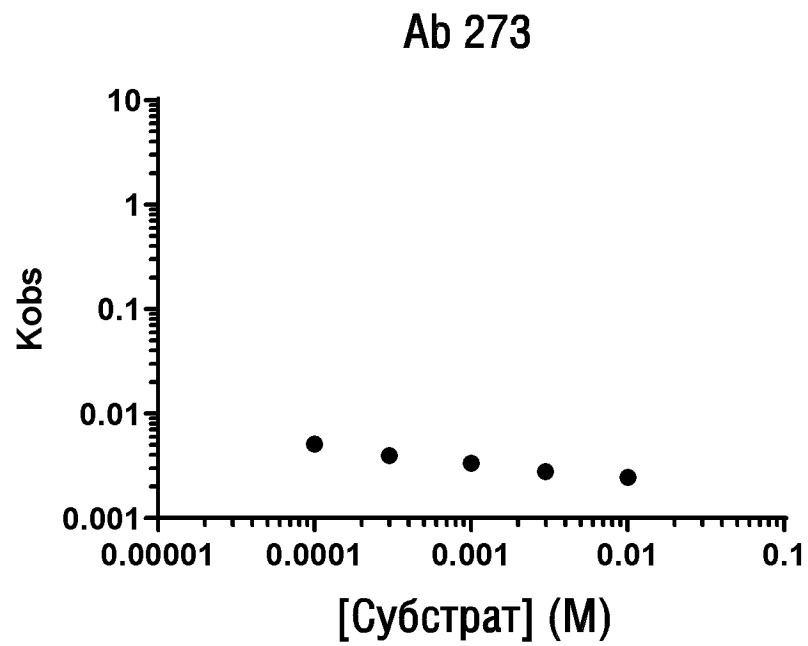
По доверенности

ФИГ.1

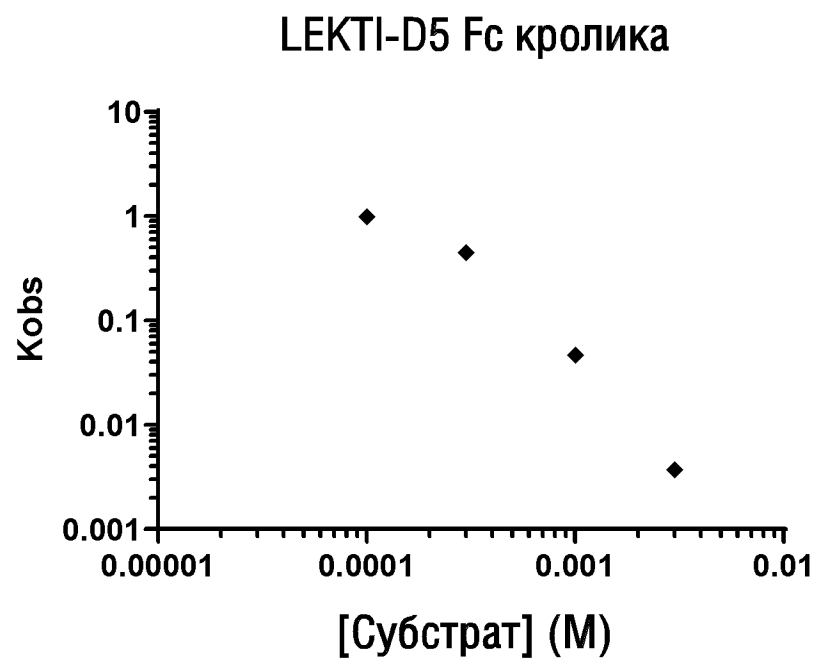


ФИГ.2

A

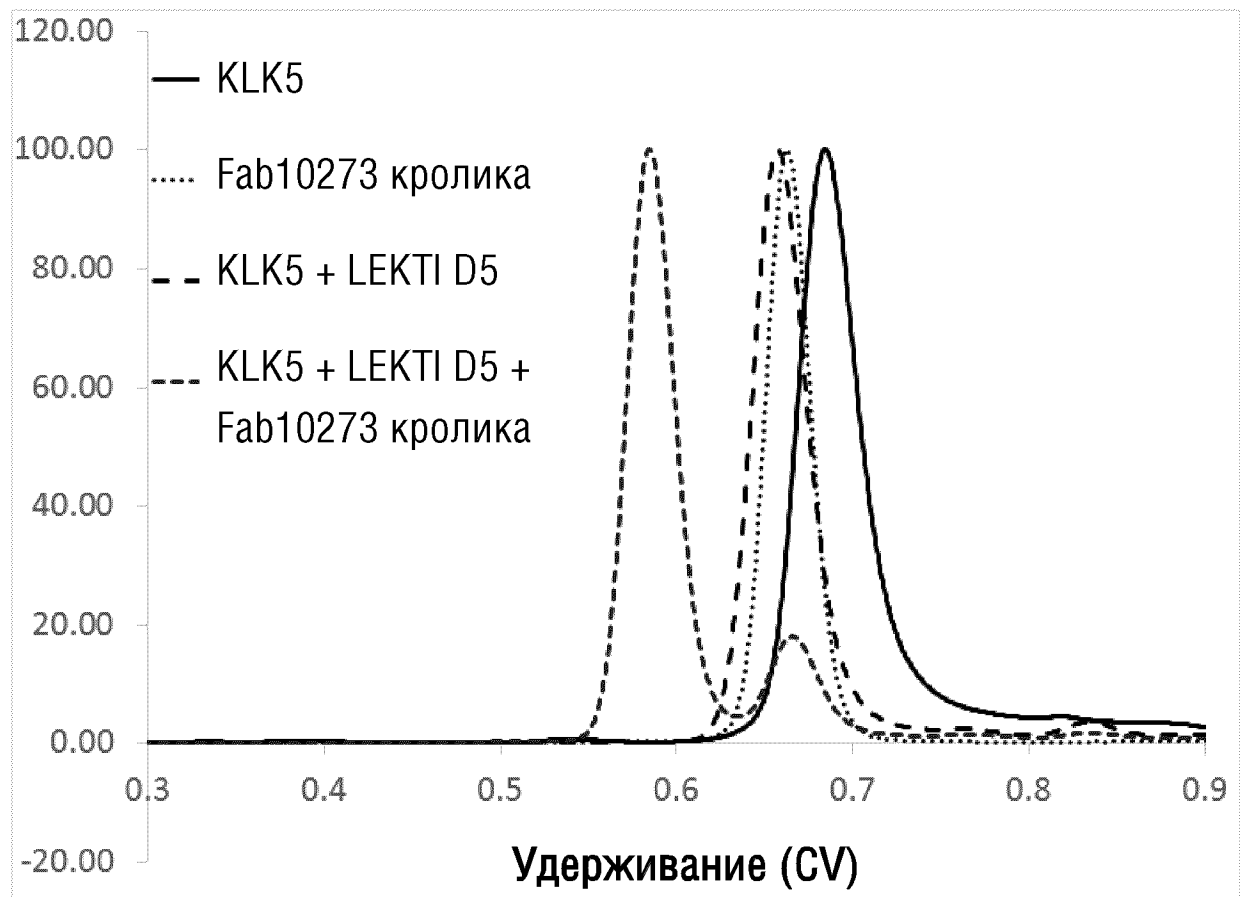


B



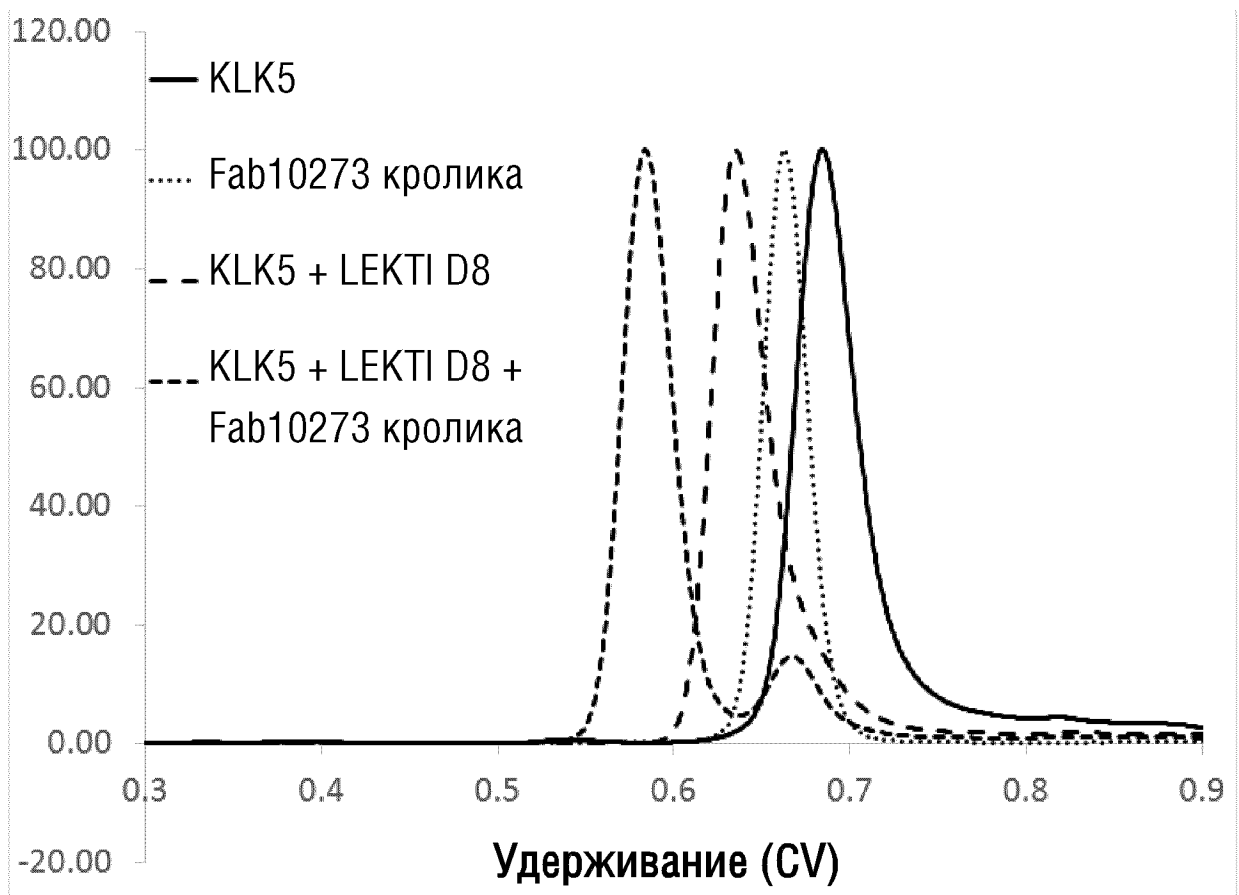
ФИГ.3

А



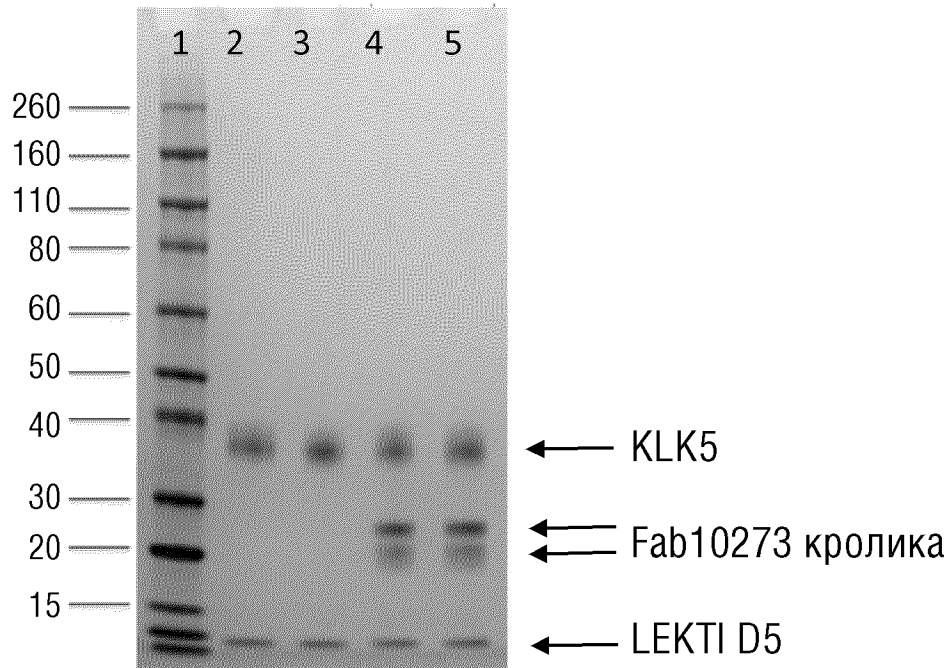
ФИГ.3 (продолжение)

В

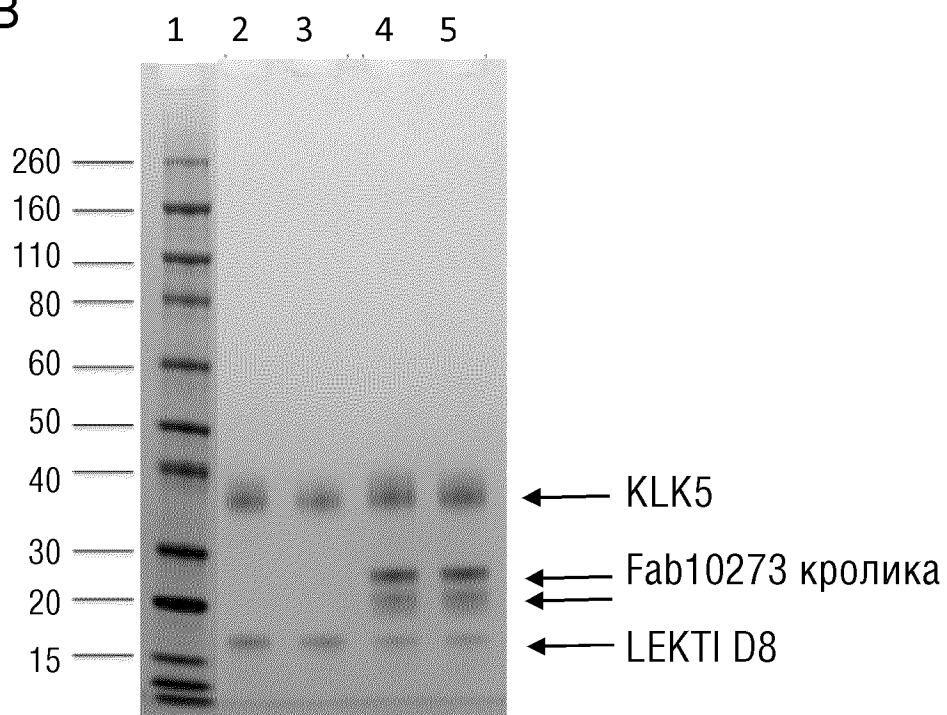


ФИГ.4

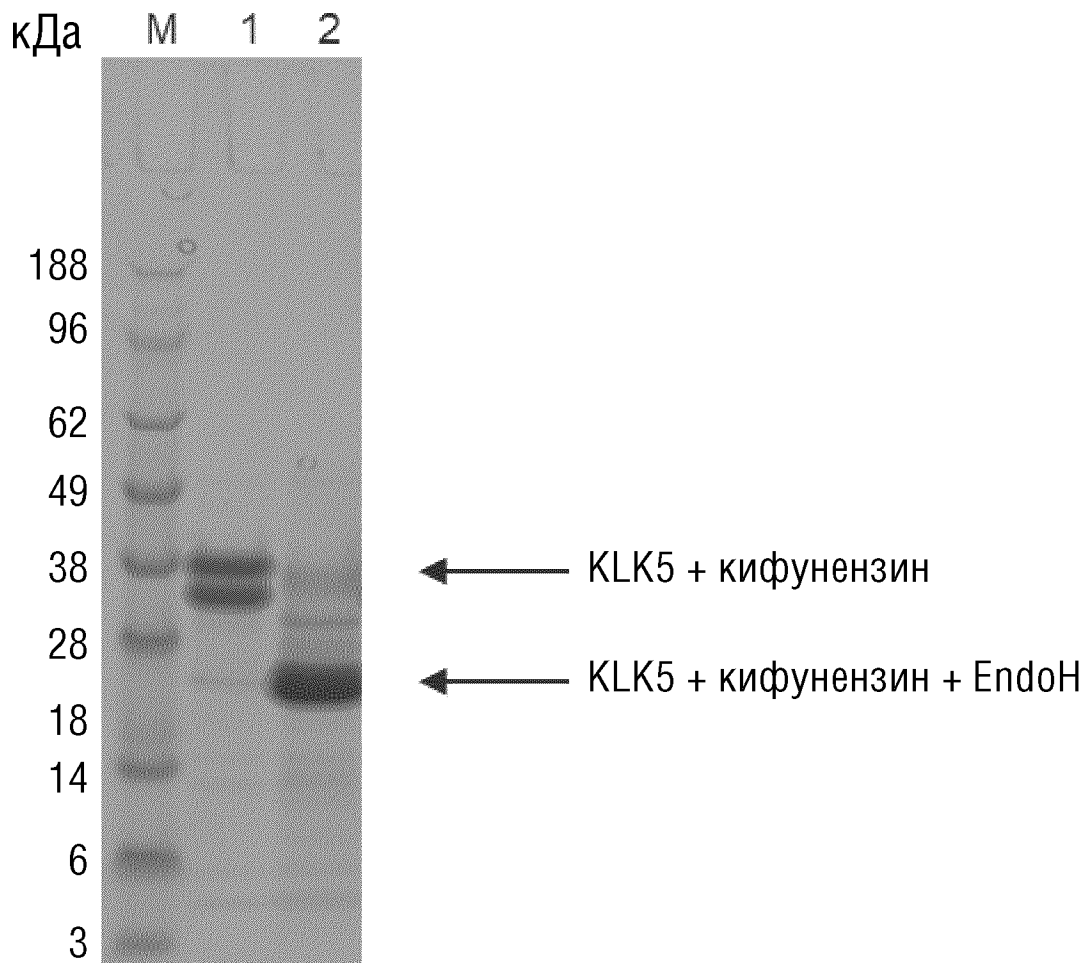
А



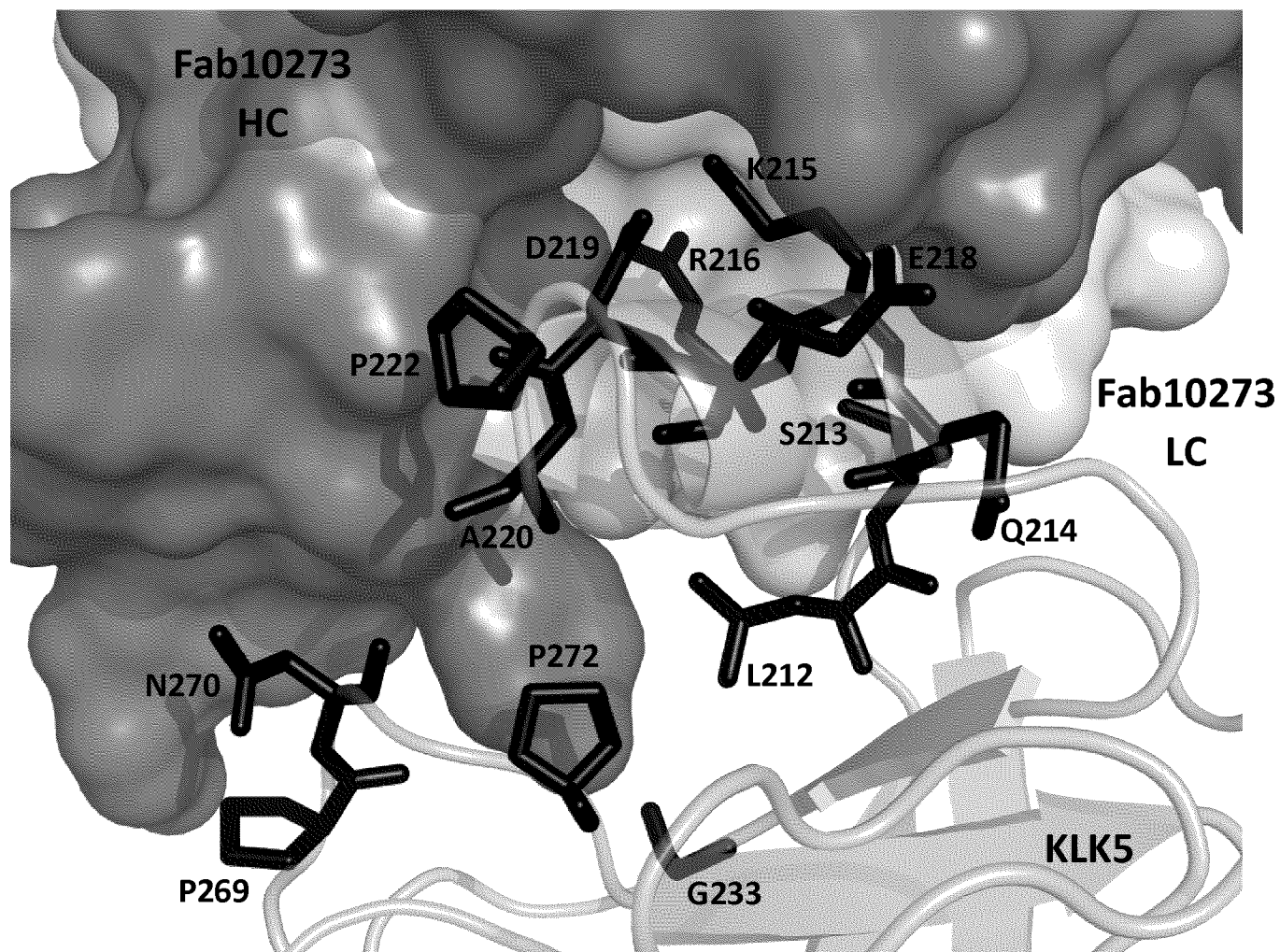
В



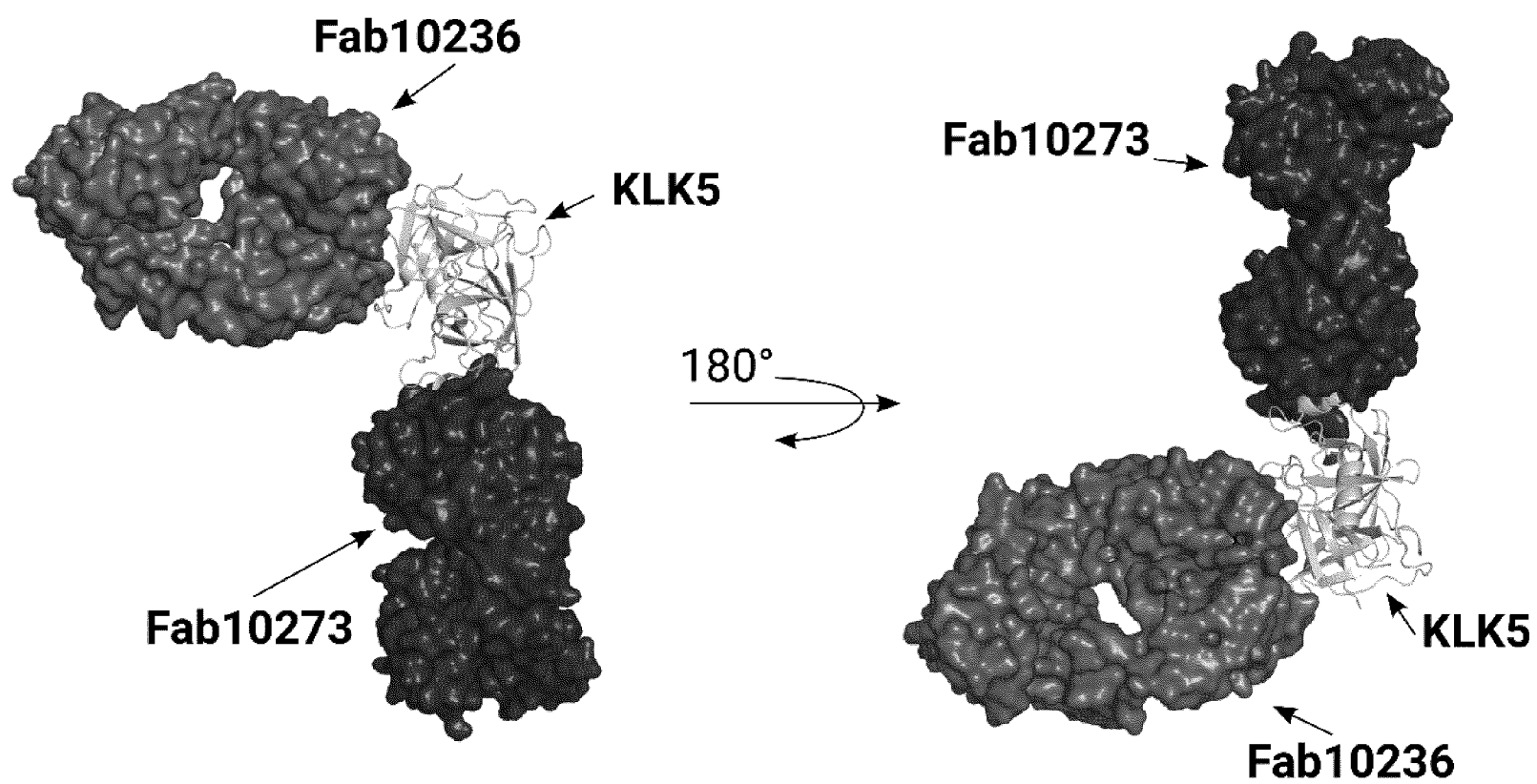
ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8

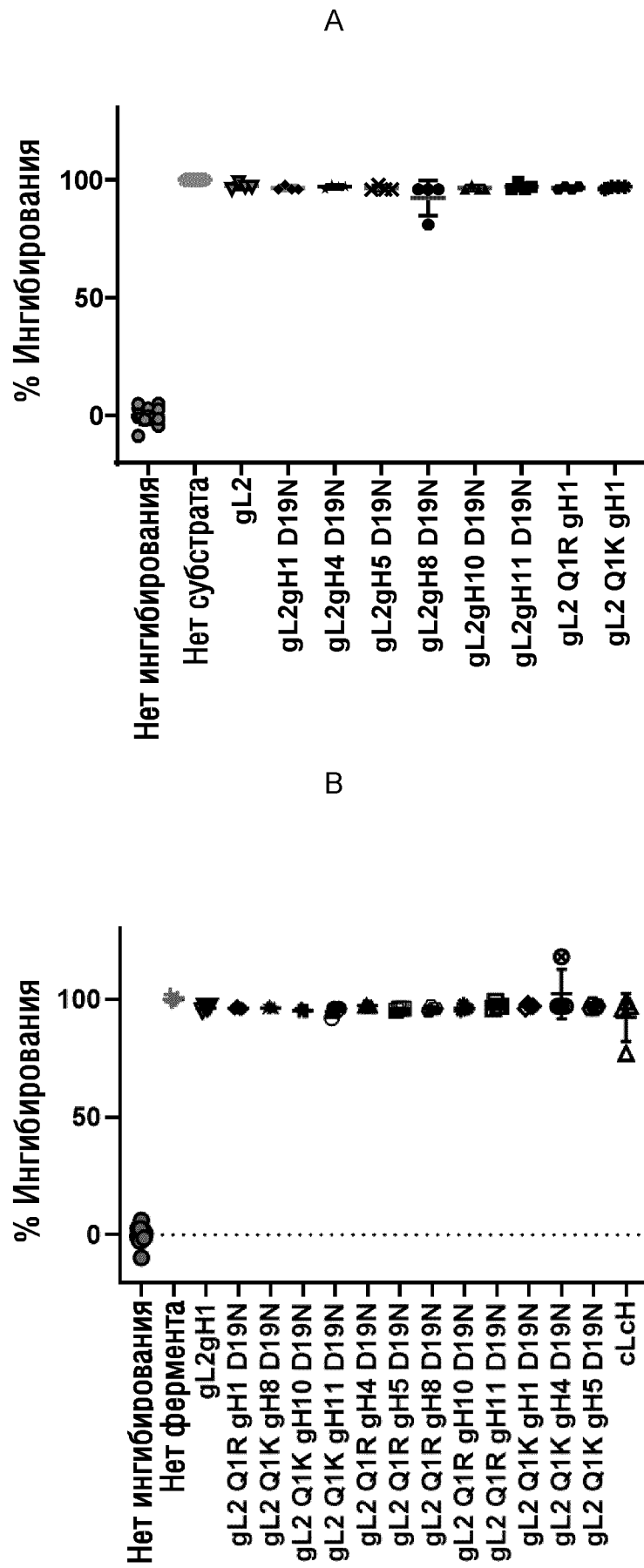
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110			
Легкая цепь 10273	AVVLTQTPSPMSAAVGGTVTISC	<u>QSSQSVYNNNDLAWY</u>					QOKPGQP	<u>PKLLIYRASTLAS</u>					GVPSR	<u>FSGSGSGTDFTLT</u>					ISGVQCDDAATYYC	<u>LGGYDDDDVDYTF</u>					FGGGTEVVVK	
IGKV1D-13	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>RASQGISS--ALAWY</u>					QOKPGKAPKLLIY	<u>DASSLES</u>					GVPSR	<u>FSGSGSGTDFTLT</u>					ISSLOPEDFATYYC	<u>---QQFN</u>					SYPLTFGGG	TKVEIK
10273gL2	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>QSSQSVYNNNDLAWY</u>					QOKPGKAPKLLIY	<u>RASTLAS</u>					GVPSR	<u>FSGSGSGTDFTLT</u>					ISSLOPEDFATYYC	<u>LGGYDDDDVDYTF</u>					FGGGTKVEIK	
10273gL2 (Q1R)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>QSSQSVYNNNDLAWY</u>					QOKPGKAPKLLIY	<u>RASTLAS</u>					GVPSR	<u>FSGSGSGTDFTLT</u>					ISSLOPEDFATYYC	<u>LGGYDDDDVDYTF</u>					FGGGTKVEIK	
10273gL2 (Q1K)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>QSSQSVYNNNDLAWY</u>					QOKPGKAPKLLIY	<u>RASTLAS</u>					GVPSR	<u>FSGSGSGTDFTLT</u>					ISSLOPEDFATYYC	<u>LGGYDDDDVDYTF</u>					FGGGTKVEIK	
10273gL2 (Q1H)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>QSSQSVYNNNDLAWY</u>					QOKPGKAPKLLIY	<u>RASTLAS</u>					GVPSR	<u>FSGSGSGTDFTLT</u>					ISSLOPEDFATYYC	<u>LGGYDDDDVDYTF</u>					FGGGTKVEIK	

ФИГ.9

Тяжелая цепь 10273
IGHV3-66

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125		
Тяжелая цепь 10273	-QSVESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYCMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKDST--TVDLKIASPTTEDTATYFCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
IGHV3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR-----Y Y Y Y Y Y GMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (D19E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH4 (D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH5 (D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH8 (D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH10 (D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH11 (D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (Y4F, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (Y6F, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (Y9F, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (Y12F, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (Y15F, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (Y16F, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (T14N, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (T14V, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											
10273gH1 (T14S, D19N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKD SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDHIYRYDDYGDYPTTYGMDPWGQGTTLVTVSS																											

ФИГ.10



ФИГ.11

