

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036255**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.20

(21) Номер заявки
201690503

(22) Дата подачи заявки
2014.08.26

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИ-CSF-1R АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 1315487.7

(32) 2013.08.30

(33) GB

(43) 2016.06.30

(86) PCT/EP2014/068050

(87) WO 2015/028455 2015.03.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Крэггз Грэм, Эрве Карин Жаннин
Мадлен, Маршалл Диана (GB)**

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

(56) WO-A2-2011140249
WO-A1-2012110360
WO-A1-2011070024
WO-A1-2013087699
WO-A1-2009026303

LIM A. K. H. ET AL.: "Antibody blockade of c-fms suppresses the progression of inflammation and injury in early diabetic nephropathy in obese db/db mice", DIABETOLOGIA; CLINICAL AND EXPERIMENTAL DIABETES AND METABOLISM, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 52, no. 8, 23 May 2009 (2009-05-23), pages 1669-1679, XP019735325, ISSN: 1432-0428, DOI: 10.1007/S00125-009-1399-3 the whole document

MACDONALD KELLI P. A ET AL.: "An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 116, no. 19, 11 November 2010 (2010-11-11), pages 3955-3963, XP002671735, ISSN: 0006-4971 the whole document

P. PAULUS ET AL.: "Colony-Stimulating Factor-1 Antibody Reverses Chemoresistance in Human MCF-7 Breast Cancer Xenografts", CANCER RESEARCH, vol. 66, no. 8, 15 April 2006 (2006-04-15), pages 4349-4356, XP055149182, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3523 the whole document

(57) Изобретение относится к анти-CSF-1R антителу и к его связывающим фрагментам; к ДНК, кодирующей это антитело и его фрагменты; к клеткам-хозяевам, содержащим указанную ДНК; и к способам экспрессии антитела или его связывающего фрагмента в клетке-хозяине. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное антитело или его связывающий фрагмент, и к применению указанного антитела, его связывающего фрагмента и композиций, содержащих это антитело или его связывающий фрагмент, для лечения заболеваний.

036255 B1

036255 B1

Изобретение относится к анти-CSF-1R антителу и к его связывающим фрагментам; к ДНК, кодирующей это антитело и его фрагменты; к клеткам-хозяевам, содержащим указанную ДНК; и к способам экспрессии антитела или его связывающего фрагмента в клетке-хозяине. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное антитело или его связывающий фрагмент, и к применению указанного антитела, его связывающего фрагмента и композиций, содержащих это антитело или его связывающий фрагмент, для лечения заболеваний.

Колонистимулирующий фактор 1 (CSF-1), также известный как макрофагальный колонистимулирующий фактор (M-CSF), представляет собой цитокин, продуцируемый различными клетками, включая макрофаги, эндотелиальные клетки и фибробласты. CSF-1 состоит из двух "мономерных" полипептидов, образующих биологически активный димерный белок CSF-1. CSF-1 существует по меньшей мере в трех зрелых формах, что обусловлено альтернативным РНК-сплайсингом (см., Cerretti et al., 1988, *Molecular Immunology*, 25:761). Эти три формы CSF-1 транслируются из различных предшественников мРНК, которые кодируют полипептидные мономеры из 256-554 аминокислот, имеющие сигнальную последовательность из 32 аминокислот у аминоконца и, предположительно, трансмембранную область приблизительно из 23 аминокислот, расположенную возле карбоксиконца. Пептиды-предшественники затем процессируются посредством протеолитического расщепления у аминоконца и карбоксиконца, что приводит к высвобождению зрелого CSF-1. Остатки 1-149 всех трех зрелых форм CSF-1 являются идентичными и, очевидно, содержат последовательности, играющие важную роль в биологической активности CSF-1. *In vivo*, мономеры CSF-1 гликозилируются и димеризуются посредством дисульфидных связей. CSF-1 принадлежит к группе биологических агонистов, стимулирующих продуцирование клеток крови. В частности, CSF-1 действует как фактор роста и дифференцировки клеток-предшественников костного мозга в мононуклеарные линии фагоцитов. Кроме того, CSF-1 стимулирует выживание, пролиферацию и функционирование макрофагов посредством специфического рецептора, присутствующего на клетках-репондерах.

Рецептор CSF-1 (CSF-1R) также называется продуктом гена *c-fms* или CD115. CSF-1R представляет собой 165 кДа-гликопротеин ТМ типа 1, принадлежащий семейству тирозинкиназных рецепторов типа III. Помимо CSF-1, лигандом для CSF-1R также служит молекула IL-34, которая имеет структурно сходную, но не родственную последовательность (Lin, et al., 2008, *Science* 320:807-811). Экспрессия CSF-1R происходит только в клетках линии дифференцировки моноцитов-макрофагов, которые циркулируют в кровотоке и присутствуют в популяциях тканевых клеток-резидентов и в остеокластах. Кроме того, CSF-1R экспрессируется в различных клетках репродуктивной системы у женщин, включая ооциты, децидуальные клетки и трофобласты.

Связывание лиганда CSF-1 с рецептором CSF-1 приводит к фосфорилированию рецептора на одном или более тирозиновых остатках под действием тирозинкиназного домена. Такое фосфорилирование может быть детектировано в присутствии антител, которые связываются с рецептором только после фосфорилирования (например, антитела против фосфо-M-CSF-рецептора (Tyr546) #3083, поставляемого Cell Signaling Technology).

Экспрессия CSF-1 и CSF-1R коррелирует с прогрессированием опухоли и с неблагоприятным прогнозом рака многих типов. Опухольассоциированные макрофаги (TAM) могут представлять собой главный компонент стромы опухоли; причем высокие уровни CSF-1 и CSF-1R ассоциируются с высокой степенью инфильтрации TAM и с неблагоприятным прогнозом раковых опухолей различных типов.

Антитела против CSF-1R известны специалистам. В публикации Sherr, C.J. et al., 1989, *Blood* 73:1786-1793 описаны антитела против CSF-1R, ингибирующие активность CSF-1 (Sherr, C.J. et al., 1989, *Blood* 73:1786-1793). В заявке WO2009/026303 описаны анти-CSF-1R антитела, которые связываются с человеческим CSF-1R, и мышинные модели опухоли *in vivo*, полученные с использованием антитела против мышинового CSF-1R. В WO2011/123381 описаны анти-CSF-1R антитела, которые интернализуют CSF-1R и обладают ADCC-активностью. В WO2011/123381 также описаны мышинные модели опухоли *in vivo*, полученные с использованием антитела против мышинового CSF-1R. В WO2011/140249 описаны анти-CSF-1R антитела, которые блокируют связывание CSF-1 с CSF-1R, а поэтому они могут быть использованы для лечения рака. В WO2009/112245 описано анти-CSF-1R антитело IgG1, которое ингибирует связывание CSF-1 с CSF-1R, а поэтому оно может быть использовано для лечения рака, воспалительного заболевания кишечника и ревматоидного артрита. В WO2011/131407 описано анти-CSF-1R антитело, которое ингибирует связывание CSF-1 с CSF-1R, а поэтому оно может быть использовано для лечения остеопороза и рака. В WO2011/107553 описано анти-CSF-1R антитело, которое ингибирует связывание CSF-1 с CSF-1R, и предполагается, что оно может быть использовано для лечения остеопороза и рака. В WO2011/070024 описаны анти-CSF-1R антитела, которые связываются с фрагментом delD4 человеческого CSF-1R.

В настоящее время необходимо разработать новые анти-CSF-1R антитела, подходящие для их применения в терапевтических целях. Хотя ранее уже было описано применение анти-CSF-1R антител для лечения некоторых видов рака, однако, необходимость в поиске новых терапевтических применений для таких антител остается актуальной.

Термин "фиброзное заболевание" означает заболевание, ассоциированное с aberrантным заживле-

нием ран, при котором в органе или в ткани образуется избыток фиброзной соединительной ткани. Осаждение и аккумуляция избытка компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген и фибронектин, приводит к отверждению и рубцеванию тканей, и в конечном счете, к недостаточности функции органов.

Примерами фиброзных заболеваний являются фиброз легких, такой как идиопатический фиброз легких и кистозный фиброз; фиброз почек; фиброз печени; цирроз печени; первичный склерозирующий холангит; первичный билиарный цирроз; фиброз эндомикарда; фиброз средостения; миелофиброз; ретроперитонеальный фиброз; прогрессирующий обширный фиброз; нефрогенный системный фиброз; болезнь Крона; келоидные рубцы; инфаркт миокарда; системный склероз; склеродермия и артрофиброз.

Ранение приводит к быстрой коагуляции и свертыванию крови с последующим образованием промежуточного внеклеточного матрикса (ЕСМ). Агрегация и активация тромбоцитов способствуют выработке воспалительного ответа, характеризующегося вазодилатацией и повышением проницаемости кровеносных сосудов, что может приводить к рекрутингу различных иммунных клеток, включая нейтрофилы, макрофаги, эозинофилы и лимфоциты. Нейтрофилы и макрофаги осуществляют санацию раны и, тем самым, снижают риск ее инфицирования, и вместе с активированными лимфоцитами секретируют различные факторы роста и цитокины, которые, в свою очередь, усиливают воспалительный ответ. Такие молекулы, как TGF β , PDGF, IL-13 активируют макрофаги, что приводит к рекрутингу, пролиферации и активации фибробластов в области раны. Активированные фибробласты или миофибробласты характеризуются экспрессией α -актина гладких мышц и секретируют коллаген и другие компоненты ЕСМ. Активированные фибробласты сжимают решетчатую структуру коллагена и подтягивают края раны к центру. Эпителиальные и эндотелиальные клетки пролиферируются и мигрируют по всему промежуточному матриксу, что приводит к регенерации пораженной ткани и к полному заживлению раны.

Персистентное отмирание или повреждение ткани или нарушение регуляции пути репарации приводит к атипичному заживлению раны. Избыточное отложение и высокий уровень перекрестного связывания коллагена и ЕСМ не способствуют образованию ткани с нормальной структурой, а вместо этого, приводят к избыточному образованию и отверждению рубцующейся ткани.

Причина развития фиброзного заболевания может зависеть от типа поражаемого органа или ткани, а этиология некоторых заболеваний, таких как идиопатический фиброз легких (ИФЛ), пока не ясна. Фиброз печени и, в конечном счете, цирроз, являются результатом хронического поражения печени, обусловленного длительным воздействием определенных факторов, включая воздействие окружающей среды, пищевых факторов или инфекционных агентов. Цирроз печени может быть вызван хроническим инфекционным гепатитом В и С. Цирроз печени может быть также вызван длительным употреблением алкоголя или пищи с высоким содержанием жира/сахара. Аналогичным образом, диабет может приводить к разрушению и рубцеванию почечной ткани, что может приводить к нарушению функции организма.

ИФЛ представляет собой одно из семи заболеваний интерстициальной ткани легких, этиология которых пока не ясна. Определенную роль в развитии этого заболевания могут играть факторы окружающей среды, такие как радиационное облучение или воздействие некоторых частиц. Курильщики также входят в группу высокого риска развития этого заболевания. После диагностики такого заболевания, продолжительность жизни пациентов является очень короткой и составляет в среднем от 2 до 5 лет.

Лечение фиброза обычно включает прием противовоспалительных агентов и иммунодепрессантов, но эти средства являются малоэффективными для таких пациентов. Отсутствие эффективных средств для лечения указанных заболеваний послужило основанием для перекалфикации ИФЛ и фиброза в целом с определением их как заболеваний с aberrантной реакцией при заживлении ран, но не как воспалительных заболеваний. Пирфенидон представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, применение которого для лечения ИФЛ было разрешено в Японии в 2008 году и в Европе в 2011 году, и действие которого, очевидно, осуществляется по множеству механизмов. В настоящее время не существует каких-либо апробированных способов направленной терапии фиброза и терапии фиброза с использованием антител.

Поэтому, существующие в настоящее время недостаточно эффективные способы лечения фиброзных заболеваний нуждаются в усовершенствовании. Так, например, в 50% случаев продолжительность жизни пациентов с ИФЛ составляет 3 года и только в 20% случаев продолжительность жизни таких пациентов составляет 5 лет, а приблизительно в 20% случаев таким пациентам требуется трансплантация.

Описание сущности изобретения

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу или его связывающему фрагменту, содержащим тяжелую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, такую как CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:4 для CDR-H1, CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:5 для CDR-H2, и CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:6 для CDR-H3, например, где CDR-H1 представляет собой SEQ ID NO: 4, CDR-H2 представляет собой SEQ ID NO: 5, а CDR-H3 представляет собой SEQ ID NO:6.

В одном из аспектов изобретения антитела или их связывающие фрагменты согласно изобретению

содержат легкую цепь, где вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, такую как CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:1 для CDR-L1, CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:2 для CDR-L2, и CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:3 для CDR-L3, например, где CDR-L1 представляет собой SEQ ID NO:1, CDR-L2 представляет собой SEQ ID NO: 2, а CDR-L3 представляет собой SEQ ID NO:3.

Антитела согласно изобретению имеют высокую аффинность связывания с CSF-1R, обладают способностью блокировать связывание лиганда с CSF-1R, не активируют CSF-1R и не интернализуют CSF-1R.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, такому как ДНК, кодирующая антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей указанный полинуклеотид.

Настоящее изобретение также относится к способам экспрессии антитела или его связывающего фрагмента.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела или их связывающие фрагменты.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу лечения, включающему введение терапевтически эффективного количества антитела, его фрагмента или композиции, описанных в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также относится к антителу, его связывающему фрагменту или композиции согласно изобретению, применяемым для лечения, а в частности для лечения рака и/или фиброзного заболевания.

Подробное описание изобретения

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к антителам согласно изобретению, которые обладают способностью блокировать связывание лиганда с CSF-1R. Используемый здесь термин "блокирование" означает физическое блокирование, такое как связывание с рецептором, но может также включать связывание антитела или его фрагментов с эпитопом, которое приводит, например, к конформационному изменению, где указанное конформационное изменение означает, что природный лиганд больше не связывается с этим рецептором (этот термин означает здесь "аллостерическое блокирование" или "аллостерическое ингибирование"). В одном из вариантов осуществления изобретения антитела согласно изобретению связываются с CSF-1R всех изоформ, например, с CSF-1R, имеющим модификации в домене ECD, такие как V23G, A245S, H247P, V279M и комбинации из двух, трех или четырех указанных модификаций.

Анализы, подходящие для определения способности антитела блокировать CSF-1R, описаны в настоящей заявке в разделе "Примеры". CSF-1 и IL-34 представляют собой лиганды для CSF-1R, а антитела согласно изобретению ингибируют активность CSF-1 и IL-34 в функциональной клеточной мембране. Также предпочтительно, чтобы антитела согласно изобретению не вызывали активацию и/или интернализацию CSF-1R. Антитела согласно изобретению также предпочтительно способствуют селективному истощению неклассической популяции моноцитов in vivo.

В общих чертах, термин "неклассические моноциты" означает моноциты с низким уровнем экспрессии CD14 и высоким уровнем экспрессии CD16. Считается, что такая популяция моноцитов представляет собой предшественники опухолеассоциированных макрофагов.

Молекулы антитела согласно изобретению могут обладать высокой аффинностью связывания. Аффинность может быть измерена любым подходящим методом, известным специалистам, включая такие методы, как поверхностный плазмонный резонанс, например, BIAcore, описанный в настоящей заявке в разделе "Примеры" и проводимый с использованием выделенного природного или рекомбинантного CSF-1R или подходящего гибрида белок/полипептид. В одном из примеров аффинность измеряют с использованием внеклеточного домена рекомбинантного человеческого CSF-1R как описано в настоящей заявке в разделе "Примеры". В одном из примеров используемым внеклеточным доменом рекомбинантного человеческого CSF-1R является мономер. В соответствии с этим молекулы антитела согласно изобретению имеют аффинность связывания с выделенным человеческим CSF-1R, составляющую приблизительно 1 нМ или менее чем 1 нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения, молекула антитела согласно изобретению имеет аффинность связывания приблизительно 500 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела согласно изобретению имеет аффинность связывания приблизительно 250 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула антитела согласно изобретению имеет аффинность связывания приблизительно 200 пМ или менее. В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу с аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или менее. В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к гуманизованному анти-CSF-1R антителу с аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или менее, предпочтительно, приблизительно 10 пМ или менее, а еще более предпочтительно, приблизительно 5 пМ или менее. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к гуманизованному анти-CSF-1R антителу с аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или менее, предпочтительно, приблизительно 10 пМ или менее, а еще более предпочтительно приблизительно 5 пМ или менее.

Чем ниже численная величина аффинности, тем выше аффинность связывания антитела или его фрагмента с антигеном.

Используемый здесь термин "человеческий CSF-1R" означает человеческий белок, называемый CSF-1R, или его биологически активный фрагмент, например, представленный в SEQ ID NO: 39 или зарегистрированный в UniProt под номером P07333. Очевидно, что экспрессированный зрелый белок не содержит сигнальной последовательности, поскольку она отщепляется после трансляции.

Авторами настоящего изобретения были получены новые анти-CSF-1R антитела, включая гуманизированные антитела. Эти антитела были получены путем иммунизации крыс крысиными фибробластами, которые были трансфецированы вектором, экспрессирующим внеклеточный домен CSF-1R. После первого скрининга супернатантов на связывание антитела с человеческим CSF-1R было идентифицировано приблизительно 1000 лунок, содержащих антитело с анти-CSF-1R-активностью. После второго скрининга антител, способных предупреждать связывание человеческого CSF-1 с человеческим CSF-1R, было идентифицировано 88 положительных лунок. После третьего скрининга антител, способных предотвращать CSF-1-зависимое выживание первичный человеческих моноцитов, было идентифицировано 18 положительных лунок. Клонирование вариабельных областей антител в этих 18 положительных лунках приводило к успешному клонированию 14 антител, и в результате последующей экспрессии было получено 9 химерных анти-CSF-1R антител, которые экспрессировались на достаточном уровне и обладали способностью ингибировать связывание с CSF-1. Эти 9 антител были секвенированы, и было обнаружено, что все эти антитела имеют уникальные последовательности и могут быть использованы в дальнейшем исследовании.

9 химерных анти-CSF-1R антител оценивали на лиганд-блокирующую активность и на способность ингибировать CSF-1- и IL-34-опосредуемое выживание моноцитов. Четыре из этих антител были выбраны как приоритетные для дальнейшего исследования, поскольку они продемонстрировали полное ингибирование связывания с CSF-1 и высокие уровни ингибирования выживания моноцитов. Эти 4 химерных анти-CSF-1R антитела были протестированы на их активность в различных анализах *in vitro* для оценки аффинности, ингибирования связывания с CSF-1, перекрестной реактивности с CSF-1R макак-резусов, собакоподобных обезьян и собак, интернализации CSF-1R и его активации. Четыре анти-CSF-1R антитела были также гуманизованы, а затем была определена аффинность этих гуманизированных привитых антител. Гуманизация двух анти-CSF-1R антител приводила к образованию полностью гуманизированных антител (не содержащих крысиных донорных остатков), имеющих аффинность (KD), эквивалентную аффинности родительского химерного антитела, и величину T_m , указывающую на то, что это антитело имеет подходящую термостабильность. В противоположность этому, другие два гуманизированных анти-CSF-1R антитела имеют более низкую аффинность связывания с CSF-1R и более низкую T_m по сравнению с химерным антителом. По этой причине, только полностью гуманизированные гибриды этих двух привитых антител, которые сохраняли свою аффинность, были экспрессированы в большом количестве для дальнейшего анализа.

Затем проводили анализ этих двух полностью гуманизированных привитых антител и анализ на ингибирование MCP-1, где ингибирование передачи CSF-1R-сигнала под действием антитела, блокирующего связывание с CSF-1, приводило к снижению уровней секреции MCP-1. Этот анализ неожиданно показал, что полностью гуманизированные привитые антитела обладали пониженной активностью по сравнению с активностью химерного антитела. На одном из предпочтительных антител, обозначенном Ab969, проводили серию экспериментов для того, чтобы выяснить, почему полностью гуманизированное привитое антитело обладает такой пониженной активностью. Был получен ряд промежуточных гуманизированных привитых антител Ab969, которые были протестированы в анализе на ингибирование MCP-1. Было обнаружено, что привитые антитела, содержащие вариабельную область легкой цепи с донорным остатком Y71, по существу, обладали активностью в анализе на ингибирование MCP-1, сравнимой с активностью химерного Ab969. Была высказана гипотеза, что такое различие активностей различных привитых антител в анализе на ингибирование MCP-1 обусловлено изменением скорости ассоциации антитела (снижением K_a) по сравнению со скоростью ассоциации химерного Ab969.

Сравнение антитела Ab969 с другими анти-CSF-1R антителами, например, с анти-CSF-1R антителом Ab970, проводимое в анализе на термостабильность, позволяет предположить, что Ab969 может быть более стабильным.

Последующий биофизический анализ гуманизированных привитых антител Ab969 показал, что при концентрировании антител наблюдалось осаждение некоторых привитых антител. Было показано, что замена лизинового остатка в положении 38 легкой цепи, например, глутамином, приводит к повышению физической стабильности.

В соответствии с этим, одно привитое антитело Ab969, Ab969.g2 (также обозначаемое Ab969) было выбрано для последующих исследований *in vitro* по характеристике этого антитела. Помимо преимуществ, которые дает высокая аффинность связывания антитела с CSF-1R, его высокая термостабильность и высокая физическая стабильность, это антитело также обнаруживало высокий уровень ингибирования IL-34-зависимой активации моноцитов, и было также обнаружено, что такое антитело обладает способностью связываться с SNP-вариантами CSF-1R. Ab969.g2 было также использовано для фармакодинами-

ческого анализа с использованием маркеров у собакоподобных обезьян, и этот анализ показал, что данное антитело связывается с CSF-1R, блокирует связывание с CSF-1 и селективно истощает неклассическую популяцию моноцитов собакоподобных обезьян *in vivo*, где указанные моноциты представляют собой клетки-предшественники опухлеассоциированных макрофагов.

В соответствии с этим в одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к антителу, содержащему тяжелую цепь и/или легкую цепь, где указанные тяжелая цепь и/или легкая цепь содержат по меньшей мере одну CDR, происходящую от анти-CSF-1R антитела 969.2.

Ab969.2 представляет собой полноразмерную гуманизованную молекулу IgG4, в которой легкая цепь содержит человеческую константную область каппа-цепи (аллотипа Km3), а тяжелая цепь содержит человеческую константную область тяжелой цепи гамма-4 с мутацией S241P, стабилизирующей шарнирную область (Angal et al., 1993). Потенциальный мотив изомеризации DG присутствует в вариательной области легкой цепи на стыке CDR-L2 и каркасной области. Последовательности тяжелой и легкой цепей полноразмерного антитела Ab969.2 представлены в SEQ ID NN: 27 и 19.

Остатки в вариательных доменах антител обычно пронумерованы по системе, предложенной Кэбатом и др., 1987. Эта система описана в публикации Rabat et al., 1987, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services, NIH, USA (такая система далее называется системой Кэбата "Rabat et al. (см. выше)"). Эта система нумерации используется во всем описании настоящей заявки, если это не оговорено особо.

Обозначение остатков по Кэбату не всегда точно соответствует линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее число или дополнительное число аминокислот по сравнению с последовательностью точно определенной нумерацией по Кэбату, что может быть вызвано укорочением или вставкой в эту последовательность структурного компонента, независимо от того, присутствует ли данная последовательность в каркасной области или в гипервариательной области (CDR) основной структуры вариательного домена. Точные положения остатков по Кэбату могут быть определены для данного антитела путем выравнивания гомологичных остатков в последовательности антитела с остатками "стандартной" последовательности, пронумерованной по Кэбату.

CDR вариательного домена тяжелой цепи расположены в положениях остатков 31-35 (CDR-H1), остатков 50-65 (CDR-H2) и остатков 95-102 (CDR-H3) в соответствии с системой нумерации по Кэбату. Однако, в соответствии с нумерацией по Чотию (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, простирается от остатка 26 до остатка 32. Используемый здесь термин "CDR-H1", если это не оговорено особо, означает остатки 26-35, как описано в комбинированной системе нумерации по Кэбату и определения топологической петли по Чотию.

CDR вариательного домена легкой цепи расположены в положениях остатков 24-34 (CDR-L1), остатков 50-56 (CDR-L2) и остатков 89-97 (CDR-L3) в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

Антитела, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены любым подходящим методом, известным специалистам. Полипептид/белок CSF-1R, включая гибридные белки, и клетки (рекомбинантные или природные), экспрессирующие указанный полипептид, могут быть использованы для продуцирования антител, специфически распознающих CSF-1R. Такой полипептид может представлять собой "зрелый" полипептид или его биологически активный фрагмент или биологически активное производное. Человеческий белок зарегистрирован в UniProt под номером P07333.

Полипептиды, используемые для иммунизации хозяина, могут быть получены способами, хорошо известными специалистам, из генетически сконструированных клеток-хозяев, содержащих экспрессионные системы, либо они могут быть выделены из природных биологических источников. В настоящей заявке, термин "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Эти термины являются синонимами, если это не оговорено особо. В некоторых случаях, полипептид CSF-1R может представлять собой часть более крупного белка, такого как гибридный белок, например, белок, присоединенный к аффинной метке, или т.п.

Если необходима иммунизация животного, то антитела против полипептида CSF-1R могут быть получены путем введения этих полипептидов животному, а предпочтительно, животному, не являющемуся человеком, в соответствии с хорошо известными и рутинными протоколами, см., например, руководство Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). При этом, могут быть иммунизованы многие теплокровные животные, такие как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи. Однако, по существу, наиболее подходящими являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Моноклональные антитела могут быть получены любым методом, известным специалистам, таким как гибридомный метод (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), триомный метод, гибридомный метод, осуществаемый с использованием человеческих В-клеток (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72), и EBV-гибридомный метод (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc.).

Антитела могут быть также получены методами конструирования антител с использованием культуры лимфоцитов путем клонирования и экспрессии кДНК вариательной области иммуноглобулина

из монокультур лимфоцитов, отобранных для продуцирования специфических антител, например, методами, описанными в публикации Babcock, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848; WO92/02551; WO04/051268 и в Международной патентной заявке WO04/106377.

Скрининг антител может быть осуществлен с помощью анализов для определения связывания с человеческим CSF-1R и/или анализов для определения способности антитела блокировать связывание лиганда с рецептором. Репрезентативные анализы описаны в настоящей заявке в разделе "Примеры".

Используемый здесь термин "специфический" относится к антителу, распознающему только антиген, к которому оно является специфичным, или к антителу, обладающему значительно большей аффинностью связывания, например, по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз большей аффинностью связывания с антигеном, к которому оно является специфичным, по сравнению с аффинностью связывания с антигенами, к которым оно не является специфичным.

Аминокислотные последовательности и полинуклеотидные последовательности некоторых антител согласно изобретению представлены на фигурах 1 и 2.

В одном из аспектов изобретения антителом является анти-CSF-1R антитело или его связывающий фрагмент, включающие тяжелую цепь, где варибельный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, такую как CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:4 для CDR-H1; CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:5 для CDR-H2; и CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:6 для CDR-H3. Предпочтительно варибельный домен тяжелой цепи содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:4 для CDR-H1; последовательность, представленную в SEQ ID NO:5 для CDR-H2; и последовательность, представленную в SEQ ID NO:6 для CDR-H3.

Во втором аспекте изобретения антителом является анти-CSF-1R антитело или его связывающий фрагмент, включающие легкую цепь, где варибельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, такую как CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:1 для CDR-L1; CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:2 для CDR-L2; и CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:3 для CDR-L3. Предпочтительно, варибельный домен легкой цепи содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:1 для CDR-L1; последовательность, представленную в SEQ ID NO:2 для CDR-L2; и последовательность, представленную в SEQ ID NO:3 для CDR-L3.

В одном из вариантов осуществления изобретения антителом согласно изобретению является анти-CSF-1R антитело или его связывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, определенную выше, и дополнительно, легкую цепь, где варибельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, такую как CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:1 для CDR-L1; CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:2 для CDR-L2; и CDR, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO:3 для CDR-L3. Варибельный домен легкой цепи, предпочтительно, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:1 для CDR-L1; последовательность, представленную в SEQ ID NO:2 для CDR-L2; и последовательность, представленную в SEQ ID NO:3 для CDR-L3.

В одном из вариантов осуществления изобретения, по меньшей мере одна аминокислота заменена консервативной аминокислотой в одной или более CDR, выбранных из группы, независимо состоящей из любой одной из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3;

любой одной из комбинаций CDR-H1 и H2, CDR-H1 и H3, CDR-H1 и L1, CDR-H1 и L2, CDR-H1 и L3, CDR-H2 и H3, CDR-H2 и L1, CDR-H2 и L2, CDR-H2 и L3, CDR-H3 и L1, CDR-H3 и L2, CDR-H3 и L3, CDR-L1 и L2, CDR-L1 и L3, CDR-L2 и L3;

CDR-H1, H2 и H3, CDR-H1, H2 и L1, CDR-H1, H2 и L2, CDR-H1, H2 и L3, CDR-H2, H3 и L1, CDR-H2, H3 и L2, CDR-H2, H3 и L3, CDR-H3, L1 и L2, CDR-H3, L1 и L3, CDR-L1, L2, L3;

любой одной из комбинаций CDR-H1, H2, H3 и L1, CDR-H1, H2, H3 и L2, CDR-H1, H2, H3 и L3, CDR-H2, H3, L1 и L2, CDR-H2, H3, L2 и L3, CDR-H3, L1, L2 и L3, CDR-L1, L2, L3 и H1, CDR-L1, L2, L3 и H2, CDR-L1, L2, L3 и H3, CDR-L2, L3, H1 и H2;

CDR-H1, H2, H3, L1 и L2, CDR-H1, H2, H3, L1 и L3, CDR-H1, H2, H3, L2 и L3, CDR-L1, L2, L3, H1 и H2, CDR-L1, L2, L3, H1 и H3, CDR-L1, L2, L3, H2 и H3; и

комбинации CDR-H1, H2, H3, L1, L2 и L3.

В одном из вариантов осуществления изобретения описанный здесь домен тяжелой цепи включает последовательность с 1, 2, 3 или 4 консервативными аминокислотными заменами, например, заменами в каркасной области.

В одном из вариантов осуществления изобретения каркасная область варибельной области тяжелой цепи содержит 1, 2, 3 или 4 аминокислоты, которые были встроены, делетированы или заменены, или их комбинации. В одном из вариантов осуществления изобретения, замененной аминокислотой является соответствующая аминокислота, происходящая от донорного антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения описанная здесь варибельная область легкой цепи включает последовательность с 1, 2, 3 или 4 консервативными аминокислотными заменами, например, заменами в каркасной области.

В одном из вариантов осуществления изобретения каркасная область вариабельной области легкой цепи содержит 1, 2, 3 или 4 аминокислоты, которые были встроены, делетированы или заменены, или их комбинации. В одном из вариантов осуществления изобретения, замененной аминокислотой является соответствующая аминокислота, происходящая от донорного антитела.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу или его связывающему фрагменту, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит три CDR, и где последовательность CDR-H1 по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична или аналогична последовательности, представленной в SEQ ID NO:4; последовательность CDR-H2 по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична или аналогична последовательности, представленной в SEQ ID NO:5; а последовательность CDR-H3 по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична или аналогична последовательности, представленной в SEQ ID NO:6. При этом, предпочтительно, анти-CSF-1R антитело или его связывающий фрагмент дополнительно содержат легкую цепь, где вариабельный домен легкой цепи содержит три CDR, и где последовательность CDR-L1 по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична или аналогична последовательности, представленной в SEQ ID NO:1; последовательность CDR-L2 по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична или аналогична последовательности, представленной в SEQ ID NO:2; а последовательность CDR-L3 по меньшей мере на 60% идентична или аналогична последовательности, представленной в SEQ ID NO:3.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к вариабельным областям, последовательности которых по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентичны или аналогичны последовательности вариабельной области, описанной в настоящей заявке. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу, которое конкурирует с антителом или его фрагментом согласно изобретению за связывание с рецептором CSF-1R, предпочтительно, с внеклеточным доменом рецептора CSF-1R, более предпочтительно, с рецептором CSF-1R, имеющим последовательность SEQ ID NO:35, 36, 37, 38 и/или 39 или последовательность, имеющуюся в базе данных UniProt под регистрационным номером P07333, а в частности, с внеклеточным доменом рецептора CSF-1R SEQ ID NO: 36 или с 498 аминокислотами внеклеточного домена, имеющегося в базе данных UniProt под регистрационным номером P07333 (аминокислотами 20-517 P07333).

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу, которое перекрестно блокирует связывание антитела, содержащего все 6 CDR, представленные в последовательности SEQ ID NO:1 для CDR-L1, SEQ ID NO:2 для CDR-L2, SEQ ID NO:3 для CDR-L3, SEQ ID NO:4 для CDR-H1, SEQ ID NO:5 для CDR-H2 и SEQ ID NO:6 для CDR-H3, например, с аффинностью 100 пМ или менее, а в частности, если такое перекрестное блокирование является аллостерическим.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу или его связывающему фрагменту, которые ингибируют или перекрестно блокируют связывание CSF-1 и/или IL-34 с внеклеточным доменом рецептора CSF-1R.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу, которое перекрестно блокирует связывание антитела, содержащего все 6 CDR, представленные в последовательности SEQ ID NO:1 для CDR-L1, SEQ ID NO:2 для CDR-L2, SEQ ID NO:3 для CDR-L3, SEQ ID NO:4 для CDR-H1, SEQ ID NO:5 для CDR-H2 и SEQ ID NO:6 для CDR-H3, например, с аффинностью 100 пМ или менее, а в частности, где указанное антитело перекрестно блокирует такое связывание посредством связывания с тем же самым эпитопом, с которым связывается антитело, которое его блокирует.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к антителу или к его связывающему фрагменту, где С-концевой остаток последовательности антитела, например, С-концевой остаток последовательности тяжелой цепи, например, концевой лизин, был отщеплен. В одном из вариантов осуществления изобретения эта аминокислота отщепляется от описанной здесь последовательности. Вообще говоря, такое отщепление происходит в результате посттрансляционных модификаций экспрессированного антитела или его связывающего фрагмента.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу согласно любому из выше- или нижеуказанных вариантов осуществления изобретения, где С-концевой лизин последовательности тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:27 или SEQ ID NO:29, отсутствовал или был делетирован. Удаление или делеция С-концевого лизина, например, в положении 453 SEQ ID NO: 27 или в положении 472 SEQ ID NO: 30 могут быть осуществлены, например, посредством экспрессии анти-CSF-1R антитела в экспрессионной системе, не кодирующей концевой лизин. Альтернативно, делеция С-концевого остатка, такого как лизин, может быть осуществлена путем посттрансляционной модификации.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его связывающие фрагменты согласно изобретению являются гуманизованными.

Используемый здесь термин "гуманизованное антитело" означает антитело или молекулу антитела, где тяжелая и/или легкая цепи содержат одну или более CDR (включая, если это необходимо, одну или более модифицированных CDR), происходящих от донорного антитела (например, мышинного моноклонального антитела) и присоединенных к каркасной области вариабельной области тяжелой и/или легкой цепей акцепторного антитела (например, человеческого антитела) (см., например, патент США 5585089;

WO91/09967). Для сведения, см. Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одном из вариантов осуществления изобретения переносят не всю CDR, то есть в каркасную область человеческого антитела переносят только один или более специфичность-определяющих остатков, происходящих от любой одной из вышеописанных CDR (см., например, Kashmiri et al. , 2005, Methods, 36:25-34). В одном из вариантов осуществления изобретения, в каркасную область человеческого антитела переносят только специфичность-определяющие остатки, происходящие от одной или более из вышеописанных CDR. В другом варианте осуществления изобретения в каркасную область человеческого антитела переносят только специфичность-определяющие остатки, происходящие от каждой из вышеописанных CDR. В случае присоединения CDR или специфичность-определяющих остатков может быть использована любая подходящая последовательность каркасной области варибельной области акцепторного антитела, имеющего такой же класс/тип, как и донорное антитело, от которого происходят эти CDR, включая каркасные области антител мышей, приматов и человека.

В соответствии с этим гуманизованное антитело согласно изобретению имеет варибельный домен, содержащий каркасные области человеческого акцепторного антитела, а также одну или более конкретно определенных здесь CDR. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, которое связывается с человеческим CSF-1R, где варибельный домен содержит каркасные области человеческого акцепторного антитела и не-человеческие донорные CDR.

Примерами человеческих каркасных областей, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Rabat et al., см. выше). Так, например, KOL и NEWM могут быть использованы для тяжелой цепи, REI может быть использована для легкой цепи, а EU, LAY и POM могут быть использованы для тяжелой цепи и легкой цепи. Альтернативно могут быть использованы последовательности человеческой зародышевой линии; и эти последовательности имеются на сайте: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>.

В гуманизованном антителе согласно изобретению, тяжелые и легкие цепи акцепторного антитела необязательно должны происходить от одного и того же антитела, и при необходимости, они могут содержать комбинации цепей, имеющих каркасные области, происходящие от различных цепей.

В одном из вариантов осуществления изобретения, человеческая каркасная область содержит 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен, добавлений или делеций, например, 1, 2, 3 или 4 консервативных замен или замен донорных остатков.

В одном из вариантов осуществления изобретения, последовательность, используемая в качестве человеческой каркасной последовательности, на 80, 85, 90, 95% или более аналогична или идентична описанной здесь последовательности.

Одна из таких каркасных областей, подходящих для тяжелой цепи гуманизованного антитела согласно изобретению, происходит от последовательности подгруппы VH2 человеческого антитела 3-1 2-70 вместе с J-областью JH3 (SEQ ID NO:33).

В соответствии с этим, в одном из своих примеров, настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, содержащему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1; последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2; и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 для CDR-H3, где каркасная область тяжелой цепи происходит от последовательности подгруппы VH3 человеческого антитела 1-3 3-07 вместе с JH4.

В одном из примеров, варибельный домен тяжелой цепи антитела содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23.

Каркасная область, подходящая для легкой цепи гуманизованного антитела согласно изобретению, происходит от последовательности подгруппы VK1 антитела человеческой зародышевой линии 2-1-(1) O12 вместе с J-областью JK4 (SEQ ID NO:31).

В соответствии с этим, в одном из своих примеров, настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, содержащему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1; последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2; и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3, где каркасная область легкой цепи происходит от последовательности подгруппы VK1 человеческого антитела 2-1-(1) O12 вместе с J-областью JK4.

В одном из примеров, варибельный домен легкой цепи антитела содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В гуманизованном антителе согласно изобретению, каркасные области необязательно должны иметь такие же последовательности, как и акцепторное антитело. Так, например, редко встречающиеся остатки могут быть заменены остатками, более часто встречающимися в акцепторной цепи этого класса или типа. Альтернативно, выбранные остатки в каркасных областях акцепторного антитела могут быть заменены так, чтобы они соответствовали остатку, присутствующему в том же положении донорного антитела (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332:323-324). Такие замены должны быть минимальными и должны быть сделаны лишь по необходимости для сохранения аффинности донорного антитела. Протокол отбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые необходимо заменить, описан в WO91/09967.

В соответствии с этим, в одном из своих примеров настоящее изобретение относится к гуманизо-

ванному антители, в котором по меньшей мере остаток в положении 78 переменного домена тяжелой цепи (в соответствии с нумерацией по Кэбату) представляет собой донорный остаток. В одном из вариантов осуществления изобретения остаток 78 переменного домена тяжелой цепи был заменен аланином.

Используемый здесь термин "донорный остаток" означает остаток нечеловеческого антитела (например, мышиногo антитела), который переносит CDR.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к гуманизованному антители, в котором переменный домен тяжелой цепи не содержит каких-либо донорных остатков.

В соответствии с этим в одном из своих примеров, настоящее изобретение относится к гуманизованному антители, где по меньшей мере один из остатков в положениях 38, 71 и 87 переменного домена легкой цепи (в соответствии с нумерацией по Кэбату) представляет собой донорный остаток. В одном из вариантов осуществления изобретения один из остатков, выбранных из остатков в положениях 38, 71 и 87 переменного домена легкой цепи (в соответствии с нумерацией по Кэбату) представляет собой донорный остаток. В одном из вариантов осуществления изобретения два остатка, выбранные из остатков в положениях 38, 71 и 87, например, 38 и 71; или 38 и 87; или 71 и 87 переменного домена легкой цепи (в соответствии с нумерацией по Кэбату), представляют собой донорные остатки. В одном из вариантов осуществления изобретения три остатка в положениях 38, 71 и 87 переменного домена легкой цепи (в соответствии с нумерацией по Кэбату) представляют собой донорные остатки.

В одном из вариантов осуществления изобретения остаток 38 переменного домена легкой цепи заменен лизином. В альтернативном варианте осуществления изобретения остаток 38 переменного домена легкой цепи заменен глутамином.

В одном из вариантов осуществления изобретения остаток 71 переменного домена легкой цепи заменен тирозином.

В одном из вариантов осуществления изобретения остаток 87 переменного домена легкой цепи заменен фенилаланином.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к гуманизованному антители, в котором только остаток 71 переменного домена легкой цепи представляет собой донорный остаток, а предпочтительно, тирозин.

В своем конкретном варианте настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антители или его связывающему фрагменту, имеющим тяжелую цепь, содержащую последовательность переменного домена тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую последовательность переменного домена легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 15.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антители или его связывающему фрагменту, которые связываются с CSF-1R, предпочтительно, с внеклеточным доменом CSF-1R, а наиболее предпочтительно, с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R, где указанное антители или его связывающий фрагмент содержат переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:15 и переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 23, а предпочтительно, где указанное антители или его связывающий фрагмент представляют собой моноклональное антители; антители IgG1- IgG2-, IgG4-типа; Fab; модифицированный Fab; Fab' ; модифицированный Fab'; F(ab')₂; Fv; однодоменные антители (например, VH или VL или VHH), scFv, двух-, трех- или четырехвалентное антители, бис-scFv, диантитело, триантитело или тетраантитело.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к последовательности антитела, которая на 80%, например на 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% аналогична или идентична описанной здесь релевантной последовательности в какой-либо ее части или по всей ее длине. В одном из вариантов осуществления изобретения указанной релевантной последовательностью является SEQ ID NO: 15. В одном из вариантов осуществления изобретения, указанной релевантной последовательностью является SEQ ID NO: 23.

Используемый здесь термин "идентичность" означает, что в любом конкретном положении сравниваемых последовательностей, аминокислотные остатки этих последовательностей являются идентичными. Используемый здесь термин "сходство" означает, что в любом конкретном положении сравниваемых последовательностей, аминокислотные остатки этих последовательностей являются аналогичными. Так, например, лейцин может быть заменен изолецином или валином. Другими аминокислотами, которые в большинстве случаев могут быть взаимозаменяемыми, являются, но не ограничиваются ими:

фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);

лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);

аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислотные боковые цепи);

аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи); и

цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серусодержащие боковые цепи). Степени идентичности и сходства могут быть легко вычислены специалистами (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) с помощью компьютерной программы BLAST™, поставляемой 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).

Молекулы антитела согласно изобретению могут содержать полноразмерную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или ее связывающий фрагмент, и могут представлять собой, но не ограничиваются ими, Fab; модифицированный Fab; Fab'; модифицированный Fab'; F(ab')₂; Fv; однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, двух-, трех- или четырехвалентные антитела, бис-scFv, диантитела, триантитела, тетраантитела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных антител (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9) :1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217) . Методы конструирования и продуцирования этих фрагментов антител хорошо известны специалистам (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181). Другими фрагментами антител, используемыми в настоящем изобретении, являются Fab- и Fab'-фрагменты, описанные в Международных патентных заявках WO05/003169, WO05/003170 и WO05/003171. Поливалентные антитела могут быть мультиспецифическими, например, биспецифическими, или моноспецифическими (см., например, WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 и WO2010/035012).

Используемый здесь термин "связывающий фрагмент антитела" означает фрагмент, способный связываться с антигеном с аффинностью, характеризующей этот фрагмент как антигенспецифический фрагмент.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к антителу, которое представляет собой гибридный белок антитела, связывающегося с CSF-1R, а именно, гибридный белок, содержащий молекулу иммуноглобулина, например, Fab- или Fab'-фрагмент, и одно или два однодоменных антитела (dAb), связанные друг с другом непосредственно или опосредованно, например, как описано в заявках WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 и WO2011/086091, содержание которых вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления изобретения, гибридный белок содержит двухдоменные антитела, например, антитела со спаренными вариабельными доменами тяжелой цепи (VH) и вариабельными доменами легкой цепи (VL), связанными, но необязательно, дисульфидной связью.

В одном из вариантов осуществления изобретения, Fab- или Fab'-элемент гибридного белка имеет такую же специфичность, как однодоменное антитело или однодоменные антитела, или аналогичную специфичность. В одном из вариантов осуществления изобретения, Fab- или Fab'-фрагменты однодоменного антитела или однодоменных антител имеют различные специфичности, то есть, иначе говоря, такой гибридный белок является поливалентным. В одном из вариантов осуществления изобретения, поливалентный гибридный белок согласно изобретению имеет альбумин-связывающий сайт, например, где спаренные VH/VL имеют альбумин-связывающий сайт.

Домены константной области молекулы антитела согласно изобретению, если они присутствуют, могут быть выбраны с учетом предполагаемой функции молекулы антитела, а в частности, желательных эффекторных функций. Так, например, домены константной области могут представлять собой домены человеческих IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Более конкретно, могут быть использованы домены константной области человеческого IgG, а в частности, изоформы IgG1 и IgG3, если данная молекула антитела предназначена для терапевтического применения и обладает эффекторными функциями. Альтернативно, если данная молекула антитела не предназначена для терапевтического применения и не обладает эффекторными функциями, то могут быть использованы изоформы IgG2 и IgG4.

В конкретном варианте осуществления изобретения, антителом согласно изобретению является антитело IgG2 или IgG4.

Следует отметить, что могут быть также использованы варианты последовательностей этих доменов константной области. Так, например, могут быть использованы молекулы IgG4, в которых серии в положении 241 был заменен пролином, как описано в публикации Angal et al. , 1993, Molecular Immunology, 1993, 30:105-108. В соответствии с этим, в том варианте осуществления изобретения, в котором антителом является антитело IgG4, такое антитело может включать мутацию S241P.

Следует также отметить, что антитела могут быть подвергнуты различным посттрансляционным модификациям. Тип и степень таких модификаций часто зависит от типа клеточных линий-хозяев, используемых для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Вариантми таких модификаций могут быть гликозилирование, окисление метионина, образование дикетопиперазина, изомеризация аспартата и дезамидирование аспарагина. Часто встречающейся модификацией является делеция карбокси-концевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) под действием карбоксипептидаз (как описано Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). В соответствии с этим, C-концевой лизин тяжелой цепи антитела может отсутствовать.

В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит домен CH1, а легкая цепь антитела содержит домен CL каппа или лямбда.

В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит домен CH1, домен CH2 и домен CH3, а легкая цепь антитела содержит домен CL каппа или лямбда.

Антитело согласно изобретению имеет тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19. Настоящее изобретение также относится к анти-CSF-1R антителу или его связывающему фрагменту, в которых тяжелая и легкая цепи по меньшей мере на 80% (предпочтительно, на 85, 90, 95 или 98%) идентичны или аналогичны тяжелой цепи, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и легкой цепи, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19. В одном из вариантов осуществления изобретения, легкая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или состоит из этой последовательности, а тяжелая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или состоит из этой последовательности. В другом варианте осуществления изобретения, легкая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 19 или состоит из этой последовательности, а тяжелая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 27 или состоит из этой последовательности, где аминокислота лизин в положении 453 SEQ ID NO: 27 отсутствует или была делетирована.

Настоящее изобретение также относится к специфической области или к специфическому эпитопу человеческого CSF-1R, которые связаны с антителом согласно изобретению, а в частности, с антителом 969.g2, содержащим последовательность тяжелой цепи gH2 (SEQ ID NO: 27) и/или последовательность легкой цепи gL7 (SEQ ID NO: 19).

Эта специфическая область или эпитоп человеческого полипептида CSF-1R могут быть идентифицированы любым подходящим методом картирования эпитопов, известным специалистам, с использованием комбинаций с любым одним из антител согласно изобретению. Примерами таких методов являются скрининг пептидов различной длины, происходящих от CSF-1R, на связывание с антителом согласно изобретению, где указанные пептиды имеют наименьший фрагмент, который может специфически связываться с антителом, и содержат последовательность эпитопа, распознаваемого антителом (например, пептид в области длиной приблизительно от 5 до 20 аминокислот, а предпочтительно, приблизительно в 7 аминокислот). Пептиды CSF-1R могут быть получены путем синтеза или протеолитического расщепления полипептида CSF-1R. Пептиды, связывающиеся с антителом, могут быть идентифицированы, например, с помощью масс-спектрометрического анализа. В другом примере, для идентификации эпитопа, связанного с антителом согласно изобретению, может быть применена ЯМР-спектроскопия или рентгеновская кристаллография. После идентификации, эпитопный фрагмент, связывающийся с антителом согласно изобретению, может быть использован, если это необходимо, в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связываются с тем же самым эпитопом.

Биологические молекулы, такие как антитела или их фрагменты, содержат кислотные и/или основные функциональные группы, сообщающие данной молекуле суммарный положительный или отрицательный заряд. Количество общего "наблюдаемого" заряда зависит от всей аминокислотной последовательности молекулы, локального окружения заряженных групп в 3D-структуре и от условий окружающей среды. Изоэлектрическая точка (pI) представляет собой pH, при котором конкретная молекула или ее доступная для растворителя поверхность не несет какого-либо суммарного электрического заряда. В одном из примеров анти-CSF-1R антитело и его фрагменты согласно изобретению могут быть сконструированы так, чтобы они имели соответствующую изоэлектрическую точку. В результате могут быть получены антитела и/или их фрагменты с улучшенными свойствами, а в частности, с подходящими профилями растворимости и/или стабильности, и/или со свойствами, обеспечивающими более высокую степень очистки.

Таким образом, в одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к гуманизованному анти-CSF-1R антителу, сконструированному так, чтобы его изоэлектрическая точка отличалась от изоэлектрической точки идентифицированного ранее антитела. Такое антитело может быть, например, сконструировано путем замены аминокислотного остатка, например, замены кислотного аминокислотного остатка одним или более основными аминокислотными остатками. Альтернативно могут быть введены основные аминокислотные остатки, либо могут быть удалены кислотные аминокислотные остатки. Альтернативно, если молекула имеет неприемлемо высокую величину pI, то для снижения pI могут быть введены, если это необходимо, кислотные остатки. Важно отметить, что при изменении pI необходимо, чтобы была сохранена нужная активность антитела или его фрагмента. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения сконструированное антитело или его фрагмент обладают такой же или, в основном, такой же активностью, как и "немодифицированное" антитело или его фрагмент.

Для предсказания изоэлектрической точки антитела или его фрагмента могут быть использованы программы, такие как **ExPASy <http://www.expasy.ch/tooIs/pitool.html>, и <http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/dabim/compo-p.html>.

Следует отметить, что аффинность антител согласно изобретению может быть изменена любым подходящим методом, известным специалистам. Следовательно настоящее изобретение также относится к вариантам молекул антитела согласно изобретению, имеющим повышенный уровень аффинности по отношению к CSF-1R. Такие варианты могут быть получены с применением ряда протоколов созревания аффинности, включая мутацию CDR (Yang et al., 1995, J. Mol. Biol., 254:392-403), перестановку цепей

(Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783), использование мутантных штаммов *E. coli* (Low et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 250:359-368), перестановку ДНК (Patten et al., 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:724-733), фаговое представление (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) и ПЦР, применяемую для диагностики заболеваний, передаваемых половым путем (Cramer et al., 1998, *Nature*, 391:288-291). Такие методы созревания аффинности обсуждаются в публикации Vaughan et al. (см. выше).

При желании, антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть конъюгировано с одной или более эффекторными молекулами. При этом следует отметить, что эффекторная молекула может включать одну эффекторную молекулу, либо две или более таких эффекторных молекул, связанных таким образом, чтобы они образовывали одну целую молекулу, которая может быть присоединена к антителам согласно изобретению. Если необходимо получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, то такой фрагмент может быть получен стандартными химическими методами или стандартными методами рекомбинантных ДНК, где фрагмент антитела присоединяют к эффекторной молекуле либо непосредственно, либо посредством связывающего агента. Методы конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны специалистам (см., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robison 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). Конкретными химическими методами являются, например, методы, описанные в заявках WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 и WO03/031581. Альтернативно, если эффекторной молекулой является белок или полипептид, то связывание может быть осуществлено методами рекомбинантных ДНК, например, методами, описанными в WO86/01533 и EP0392745.

Используемый здесь термин "эффекторная молекула" включает, например, противоопухолевые агенты; лекарственные средства; токсины; биологически активные белки, например, ферменты; другие антитела или их фрагменты; синтетические или природные полимеры; нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например, ДНК, РНК и их фрагменты; радионуклиды, а в частности, радиоидид, радиоизотопы, металлы, образующие хелатные комплексы; наночастицы; и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые могут быть детектированы с помощью ЯМР-спектроскопии или спектроскопии методом электронапыления.

Примерами эффекторных молекул могут быть цитотоксины или цитотоксические агенты, включая любой агент, который оказывает негативное воздействие на клетки (например, уничтожает клетки). Примерами таких молекул являются комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромин и их аналоги или гомологи.

Эффекторными молекулами также являются, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, хлорамбуцил тиотепа, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманнит, стрептозотоцин, митомин C и цисплатин, то есть, цис-дихлордиамин-платина (II) (DDP)), антрациклины (например, даунорубин (прежнее название дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин)), блеомицин, митрамицин, антрамицин (AMC), калихеамицины или дуокармицины) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другими эффекторными молекулами могут быть хелатообразующие 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 ограничивающиеся ими, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другими эффекторными молекулами являются белки, пептиды и ферменты. Представляющими интерес ферментами являются, но не ограничиваются ими, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы и трансферазы. Представляющими интерес белками, полипептидами и пептидами являются, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин; белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервных клеток, тромбоцитарный фактор роста или тканевый активатор плазминогена; антитромботический агент или антиангиогенный агент, например, ангиостатин или эндостатин; или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), фактор роста нервных клеток (NGF) или другие факторы роста и иммуноглобулины.

Другими эффекторными молекулами могут быть детектируемые вещества, которые могут быть использованы, например, в диагностике. Примерами детектируемых веществ являются различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества, радиоактивные нуклиды, позитрон-излучающие металлы (используемые в позитронно-эмиссионной томографии) и ионы нерадиоактивных металлов, обладающих парамагнитными свойствами. В общих чертах, см. патент США No. 4741900, где описаны ионы металлов, которые могут быть

конъюгированы с антителами, используемыми в диагностике. Подходящими ферментами являются пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; подходящими простетическими группами являются стрептавидин, авидин и биотин; подходящими флуоресцентными веществами являются умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин-флуоресцеин, данзилхлорид и фикоэритрин; подходящим люминесцентным веществом является люминол; подходящими биолюминесцентными веществами являются люцифераза, люциферин и экворин, а подходящими радионуклидами являются ^{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 повышать эффективность доставки антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примерами подходящих эффекторных молекул этого типа являются полимеры, альбумин, альбуминсвязывающие белки или альбуминсвязывающие соединения, такие как соединения, описанные в WO05/117984.

В одном из вариантов осуществления изобретения, предпочтительным является время полужизни, обеспечиваемое эффекторной молекулой независимо от CSF-1R.

Если эффекторной молекулой является полимер, то таким полимером может быть, в основном, синтетический или природный полимер, например необязательно замещенный прямой или разветвленный полиалкиленовый, полиалкениленовый или полиоксиалкиленовый полимер, или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например гомо- или гетерополисахарид.

Конкретными необязательными заместителями, которые могут присутствовать на вышеупомянутых синтетических полимерах, являются одна или более групп, таких как гидроксигруппы, метильные группы или метоксигруппы.

Конкретными примерами синтетических полимеров являются необязательно замещенные прямые или разветвленные полиэтиленгликоли, полипропиленгликоли, поливиниловые спирты или их производные, а в частности, необязательно замещенный полиэтиленгликоль, такой как метоксиполиэтиленгликоль или его производные.

Конкретными природными полимерами являются лактоза, амилоза, декстран, гликоген или их производные.

В одном из вариантов осуществления изобретения, полимером является альбумин или его фрагмент, такой как альбумин человеческой сыворотки или его фрагмент.

Используемый здесь термин "производные" включает реакционноспособные производные, например, тиолселективные реакционноспособные группы, такие как малеимиды и т.п. Реакционноспособная группа может быть присоединена к полимеру непосредственно или посредством линкерного сегмента. При этом следует отметить, что в некоторых случаях, остаток этой группы образует часть такого продукта, как линкерная группа, расположенная между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера может варьироваться в зависимости от целей его применения, но обычно средняя молекулярная масса полимера составляет от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да, например от 20000 до 40000 Да. В частности размер полимера может быть выбран в зависимости от цели применения данного продукта, например, от его способности локализоваться в некоторых тканях, таких как опухоли, или от продолжительности времени полужизни данного полимера в кровотоке (см. обзорную статью Charman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Так, например, если необходимо, чтобы данный продукт покидал кровотоки и проникал в ткань, например, чтобы его можно было использовать для лечения опухоли, то предпочтительно использовать низкомолекулярный полимер, например, полимер с молекулярной массой приблизительно 5000 Да. Если необходимо, чтобы данный продукт оставался в кровотоке, то предпочтительно использовать полимер с более высокой молекулярной массой, например, с молекулярной массой в пределах от 20000 до 40000 Да.

Подходящими полимерами являются полиалкиленовый полимер, такой как полиэтиленгликоль, или в частности, метоксиполиэтиленгликоль или его производные, а в частности, полимер с молекулярной массой в пределах от 15000 до 40000 Да.

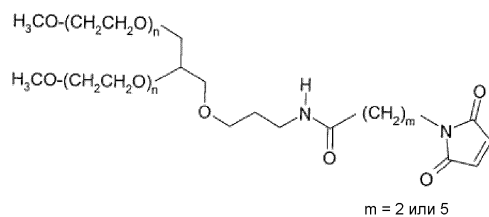
В одном из примеров антитела, применяемые в настоящем изобретении, присоединяют к молекулам полиэтиленгликоля (ПЭГ). В одном из конкретных примеров, антителом является фрагмент антитела, к которому могут быть присоединены молекулы ПЭГ посредством любой доступной боковой цепи или концевой функциональной группы аминокислоты, находящейся во фрагменте антитела, например, любой свободной аминокислоты, иминогруппы, тиоловой группы, гидроксильной группы или карбоксильной группы. Такие аминокислоты, которые присутствуют в данном фрагменте антитела, могут быть природными, либо они могут быть введены в этот фрагмент методами рекомбинантных ДНК (см., например, патенты США 5219996; US 5667425; и заявки WO98/25971, WO2008/038024). В одном из примеров молекулой антитела согласно изобретению является модифицированный Fab-фрагмент, где модификацию осуществляют путем присоединения к С-концу его тяжелой цепи одной или более аминокислот, а затем присоединения эффекторной молекулы. В соответствии с этим эти дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или более цистеиновых остатков, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Для присоединения двух или более молекул ПЭГ может быть использовано множество сайтов.

В соответствии с этим молекулы ПЭГ ковалентно присоединяют посредством тиоловой группы по меньшей мере одного цистеинового остатка, присутствующего во фрагменте антитела. Каждая молекула полимера, присоединенная к модифицированному фрагменту антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы цистеинового остатка, находящегося в этом фрагменте. Ковалентной связью обычно является дисульфидная связь или, в частности, сероуглеродная связь. Если тиоловая группа служит в качестве сайта присоединения соответствующим образом активированных эффекторных молекул, то могут быть использованы, например, селективные производные тиола, такие как производные малеимида и цистеина. Активированный полимер может быть использован в качестве исходного соединения при получении модифицированных полимером фрагментов антитела, описанных выше. Активированным полимером может быть любой полимер, содержащий реакционноспособную тиоловую группу, такую как α -галогенкарбоновая кислота или сложный эфир, например, иодацетамид, имид, например, малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные соединения могут быть коммерчески доступными (например, они могут быть закуплены у компании Nektar, прежнее название Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA), либо они могут быть получены из коммерчески доступных исходных материалов стандартными химическими методами. Конкретными молекулами ПЭГ являются метокси-ПЭГ-амин 20K (закупленный у компании Nektar, прежнее название Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и М-ПЭГ-SPA (закупленный у компании Nektar, прежнее название Shearwater).

В одном из вариантов осуществления изобретения антителом является модифицированный Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или ди-Fab, который является ПЭгилированным, то есть, имеет молекулу ПЭГ (полиэтиленгликоля), ковалентно присоединенную, например, методом, описанным в EP0948544 или EP1090037 [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 из примеров ПЭГ присоединен к цистеину в шарнирной области. В одном из примеров ПЭГ-модифицированный Fab-фрагмент имеет малеимидную группу, ковалентно связанную с одной тиоловой группой в модифицированной шарнирной области. Лизиновый остаток может быть ковалентно связан с малеимидной группой, и к каждой из аминогрупп на лизиновом остатке может быть присоединен метоксиполиэтиленгликолевый полимер, имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Следовательно, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab-фрагменту, может составлять приблизительно 40000 Да.

Конкретными молекулами ПЭГ являются 2-[3-(N-малеимидо)пропионамидо]этиламин лизина, модифицированного N,N'-бис(метоксиполиэтиленгликолем) MW 20000), также известный как PEG2MAL40K (поставляемый компанией Nektar, прежнее название Shearwater).

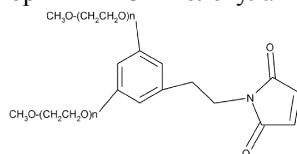
Альтернативными источниками ПЭГ-линкеров являются NOF, который поставляется под торговым знаком GL2-400MA3 (где m в нижеприведенной формуле равно 5) и GL2-400MA (где m равно 2), а n равно приблизительно 450:



То есть, каждый ПЭГ имеет молекулярную массу приблизительно 20000 Да.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, ПЭГ представляет собой 2,3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-{[3-(6-малеимидо-1-оксогексил)амино]пропилокси}гексан (разветвленный ПЭГ с 2 ветвями, - (CH₂)₃NHCO(CH₂)₅-MAL, молекулярная масса 40000), известный как SUN-BRIGHT GL2-400MA3.

Другими альтернативными эффекторными ПЭГ-молекулами являются молекулы следующего типа:



В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к антителу, такому как полноразмерное антитело, которое является ПЭгилированным (например, содержит ПЭГ, описанный выше), где ПЭГ присоединен к цистеиновому аминокислотному остатку в положении или приблизительно в положении 226 аминокислоты данной цепи, например, в положении 226 аминокислоты тяжелой цепи (в соответствии с последовательной нумерацией).

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к молекуле Fab'-ПЭГ, содержащей

один или более полимеров ПЭГ, например, 1 или 2 полимера, таких как полимеры с молекулярной массой 40 кДа.

Молекулы Fab-ПЭГ согласно изобретению могут быть особенно предпочтительными, поскольку их время полужизни не зависит от Fc-фрагмента.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к scFv, конъюгированному с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина.

В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело или его фрагмент конъюгируют с молекулой крахмала, например, для увеличения времени полужизни. Методы конъюгирования исходного вещества с белком описаны в патенте США 8017739, который вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Используемый здесь термин "репортерная молекула" означает молекулу, которая может быть детектирована, например, флуоресцентный краситель, радиоактивную метку или другую детектируемую молекулу.

Настоящее изобретение также относится к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую(ые) и/или легкую(ие) цепь(и) молекулы антитела согласно изобретению. В соответствии с этим последовательность ДНК кодирует тяжелую или легкую цепь молекулы антитела согласно изобретению. Последовательность ДНК согласно изобретению может включать синтетическую ДНК, например, полученную путем химической обработки; кДНК; геномную ДНК или любую их комбинацию.

Последовательности ДНК, кодирующие молекулу антитела согласно изобретению, могут быть получены методами, хорошо известными специалистам. Так, например, последовательности ДНК, кодирующие часть тяжелой и легкой цепей антитела или полноразмерные цепи этого антитела, могут быть синтезированы, если это необходимо, из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

ДНК, кодирующая акцепторные каркасные последовательности, хорошо известна специалистам и может быть легко синтезирована на основе известных аминокислотных последовательностей.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела согласно изобретению, могут быть применены стандартные методы молекулярной биологии. Нужные последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично методами олигонуклеотидного синтеза. При необходимости могут быть применены методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Примеры подходящих последовательностей ДНК представлены на фиг. 1.

Настоящее изобретение также относится к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или более последовательностей ДНК согласно изобретению. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или более последовательностей ДНК, кодирующих антитело согласно изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретения, такой вектор содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 28 и/или SEQ ID NO: 20. В соответствии с этим, клонирующий или экспрессионный вектор содержит две последовательности ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепь молекулы антитела согласно изобретению, предпочтительно, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 20, соответственно, и подходящие сигнальные последовательности. В одном из примеров, указанный вектор содержит межгенную последовательность, расположенную между тяжелой и легкой цепями (см. WO03/048208).

Общие методы конструирования векторов, методы трансфекции и методы культивирования хорошо известны специалистам. Описание этих методов можно найти в публикациях "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York, и в руководстве Maniatis Manual, выпущенном издательством Cold Spring Harbor Publishing.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей один или более клонирующих или экспрессионных векторов, включающих одну или более последовательностей ДНК, кодирующих антитело согласно изобретению. Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела согласно изобретению, может быть использована любая подходящая система клеток-хозяев/векторов. При этом могут быть использованы бактериальные системы, например, E. coli и другие микробные системы, или эукариотические системы, например, экспрессионные системы клеток-хозяев млекопитающих. Подходящими клетками-хозяевами млекопитающих являются клетки CHO, миеломные или гибридомные клетки.

Настоящее изобретение также относится к способу продуцирования молекулы антитела согласно изобретению, где указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор согласно изобретению, в условиях, подходящих для стимуляции экспрессии белка из ДНК, кодирующий молекулу антитела согласно изобретению, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела может включать полипептид только тяжелой цепи или только легкой цепи, и в этом случае, для трансфекции клеток-хозяев необходимо использовать последовательность, кодирующую полипептид только тяжелой цепи или только легкой цепи. Для получения продуктов, содержащих тяжелую и легкую цепи, клеточная линия может быть трансфецирована двумя векторами, а именно, первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тя-

желой цепи. Альтернативно, может быть использован один вектор, то есть, вектор, включающий последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Антитела и их фрагменты согласно изобретению экспрессируются из клеток-хозяев на достаточно высоком уровне. Таким образом, антитела и/или их связывающие фрагменты обладают свойствами, подходящими для их экспрессии в промышленном масштабе.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу культивирования клетки-хозяина и экспрессии антитела или его фрагмента; выделения такого антитела или его фрагмента, и, необязательно, их очистки с получением выделенного антитела или его фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный способ также включает стадию конъюгирования эффекторной молекулы с выделенным антителом или с его фрагментом, например, конъюгирования с полимером ПЭГ, в частности, как описано выше.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу очистки антитела (в частности, антитела или его фрагмента согласно изобретению), где указанный способ включает осуществление анионообменной хроматографии в несвязывающем режиме так, чтобы примеси удерживались на колонке, а антитело элюировалось с этой колонки.

В одном из вариантов осуществления изобретения очистку проводят путем аффинного захвата на колонке с CSF-1R.

В одном из вариантов осуществления изобретения очистку гибридных молекул альбумина или молекул конъюгата альбумина осуществляют с использованием цибакронового синего или т.п.

Подходящими ионообменными смолами, используемыми в этом способе, являются смола Q.FF (поставляемая GE-Healthcare). Эта стадия очистки может быть, например, осуществлена при pH приблизительно 8.

Указанный способ может также включать проведение первой стадии захвата посредством катионообменной хроматографии, например, при pH приблизительно от 4 до 5, а именно, при 4,5. Катионообменная хроматография может быть проведена, например, с использованием смолы, такой как смола CartoS или SP-сефароза FF (поставляемая GE-Healthcare). Затем, антитело или его фрагмент могут быть элюированы из смолы с использованием ионного солевого раствора, такого как хлорид натрия, например, в концентрации 200 мМ.

Таким образом, стадия или стадии хроматографии могут включать, если это необходимо, одну или более стадий промывки.

Способ очистки может также включать проведение одной или более стадий фильтрации, таких как стадия диафильтрации.

Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к очищенному анти-CSF-1R антителу или его фрагменту, например к гуманизованному антителу или его фрагменту, а в частности к антителу или его фрагменту согласно изобретению, по существу, в очищенной форме, а в частности в форме, не содержащей или почти не содержащей эндотоксина и/или белка или ДНК клеток-хозяев.

Используемый выше термин "очищенная форма" означает чистоту по меньшей мере 90%, например, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 мас.% или более.

Используемый здесь термин "по существу, не содержащий эндотоксина", обычно означает, что содержание эндотоксина составляет 1 ЭЕ на 1 мг продукта антитела или менее, например, 0,5 или 0,1 ЭЕ на мг продукта.

Используемый здесь термин "по существу, не содержащий белка или ДНК клетки-хозяина" обычно означает, что содержание белка или ДНК клетки-хозяина составляет 400 мкг на мг продукта антитела или менее, например, 100 мкг на мг или менее, а в частности, если это необходимо, 20 мкг на мг такого продукта.

Настоящее изобретение также относится к анти-CSF-1R антителу (или к фармацевтической композиции, содержащей это антитело) согласно изобретению, которое может быть использовано в качестве лекарственного препарата.

Настоящее изобретение также относится к анти-CSF-1R антителу (или к фармацевтической композиции, содержащей это антитело) согласно изобретению, которое может быть использовано для лечения рака.

Настоящее изобретение также относится к применению анти-CSF-1R антитела (или фармацевтической композиции, содержащей это антитело) согласно изобретению для приготовления лекарственного препарата для лечения или профилактики рака.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения человека, страдающего раком, или предупреждения рака у человека с риском развития у него такого заболевания, где указанный способ включает введение указанному человеку эффективного количества анти-CSF-1R антитела согласно изобретению.

Антитело согласно изобретению может быть использовано для лечения рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака кости, миеломы, рака прямой и ободочной кишки, лейкоза, лимфомы, рака кожи, такого как меланома, рака пищевода, рака же-

лудка, астроцитарно-клеточного рака, рака эндометрия, рак шейки матки, рака мочевого пузыря, рака почек, рака легких, рака печени, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы и рака яичника.

В одном из вариантов осуществления изобретения, раком являются метастазирующий рак, при котором возникают метастазы, переносимые из любых вышеупомянутых первичных раковых опухолей, а в частности, раковых опухолей кости.

Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что анти-CSF-1R антитело, которое ингибирует активность CSF-1R, является эффективным для лечения фиброзного заболевания. В частности, авторами изобретения было продемонстрировано, что анти-CSF-1R антитело является активным у животного с моделью фиброза легких *in vivo*.

Настоящее изобретение также относится к анти-CSF-1R антителу (или к фармацевтической композиции, содержащей это антитело) согласно изобретению, которое может быть использовано для лечения фиброзного заболевания.

Настоящее изобретение также относится к применению анти-CSF-1R антитела (или фармацевтической композиции, содержащей это антитело) согласно изобретению для приготовления лекарственного препарата для лечения или профилактики фиброзного заболевания.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения человека, страдающего фиброзным заболеванием, или предупреждения фиброзного заболевания у человека с риском развития у него такого заболевания, где указанный способ включает введение указанному человеку эффективного количества анти-CSF-1R антитела согласно изобретению.

В описании настоящей заявки, термин "фиброзное заболевание" включает заболевания, характеризующиеся aberrантным заживлением ран, при котором в органе или в ткани образуется избыток фиброзной соединительной ткани.

Репрезентативными фиброзными заболеваниями являются, но не ограничиваются ими, фиброз легких, такой как идиопатический фиброз легких и кистозный фиброз; фиброз почек, включая атрофию канальцев и интерстициальный фиброз; фиброз печени; цирроз печени; первичный склерозирующий холангит; первичный билиарный цирроз; фиброз эндомиокарда; фиброз средостения; миелофиброз; ретроперитонеальный фиброз; прогрессирующий обширный фиброз; нефрогенный системный фиброз; болезнь Крона; келоидные рубцы; инфаркт миокарда; склеродермия; системный склероз и артрофиброз.

В одном из вариантов осуществления изобретения, антитела или их фрагменты согласно изобретению используют для лечения или профилактики рака или фиброзного заболевания.

Антитело согласно изобретению может быть использовано для лечения воспалительных заболеваний, например, воспалительного артрита, атеросклероза, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, ревматоидного спондилита, анкилозирующего спондилита, артрита, псориатического артрита, ревматоидного артрита, остеоартрита, экземы, контактного дерматита, псориаза, синдрома токсического шока, сепсиса, септического шока, эндотоксического шока, астмы, хронического воспалительного заболевания легких, силикоза, саркоидоза легких, остеопороза, рестеноза, реперфузионного поражения сердца и почек, тромбоза, гломерулонефрита, диабета, реакции "трансплантат против хозяина", отторжения аллотрансплантата, рассеянного склероза, дегенерации мышц, мышечной дистрофии, болезни Альцгеймера и инсульта.

Антитела и их фрагменты согласно изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики заболеваний.

Молекула антитела согласно изобретению может быть также использована в диагностике, например, для установления диагноза *in vivo* и визуализации патологий, ассоциированных с CSF-1R.

Поскольку антитела согласно изобретению могут быть использованы для лечения и/или профилактики патологического состояния, то настоящее изобретение также относится к фармацевтической или диагностической композиции, содержащей молекулу антитела согласно изобретению в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к применению антитела согласно изобретению для приготовления лекарственного препарата. Указанная композиция чаще всего доставляется как часть стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция согласно изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической или диагностической композиции, где указанный способ включает добавление и смешивание молекулы антитела согласно изобретению с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Молекула антитела может представлять собой единственный активный ингредиент в фармацевтической или диагностической композиции. Альтернативно, антитело может быть введено в комбинации с одним или более другими терапевтически активными ингредиентами, и такое введение может быть осуществлено одновременно, последовательно или по отдельности. В соответствии с этим, молекула антитела может присутствовать в фармацевтической или диагностической композиции вместе с другими ак-

тивными ингредиентами, включая ингредиенты антител, направленных против других антигенов, таких как, например, рецепторы, принадлежащие к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR, HER-2), рецепторы васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGFR) и рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), или ингредиенты, не относящиеся к антителам, такие как иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, базутиниб, гефитиниб, эрлотиниб, темсиролимус, вандетаниб, вемурафениб, кризотиниб, вориностат, ромидепсин, бортезомиб, сорафениб, сунитиниб, регорафениб, кабозантиниб, перфенидон, стероиды или другие молекулы лекарственных средств, а в частности, молекулы лекарственных средств, время полужизни которых не зависит от связывания с CSF-1R.

Используемый здесь термин "активный ингредиент" означает ингредиент, который, при его введении в релевантной дозе, дает фармакологический эффект, такой как терапевтический эффект.

Подходящие фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективное количество антитела согласно изобретению. Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" означает количество терапевтического агента, необходимое для лечения, ослабления симптомов или предупреждения рассматриваемого заболевания или состояния, или для достижения детектируемого терапевтического, фармакологического или профилактического эффекта. Для любого антитела, терапевтически эффективное количество может быть сначала установлено с помощью анализов клеточной культуры или на животных-моделях, а обычно на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Животное-модель может быть также использовано для определения соответствующих пределов концентраций и способа введения. Такая информация может быть затем использована для вычисления подходящих доз и определения способов их введения человеку.

Точное терапевтически эффективное количество, вводимое человеку, зависит от тяжести патологического состояния, общего состояния здоровья индивидуума, возраста, массы, пола и режима питания индивидуума, времени и частоты введения, комбинации(й) лекарственных средств, ответной реакции индивидуума и переносимости им лечения/восприимчивости к такому лечению. Это количество может быть определено путем рутинного экспериментирования и назначается врачом-клиницистом. В общих чертах, терапевтически эффективное количество составляет от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, например, от 0,1 мг/кг до 200 мг/кг, а именно, 100 мг/кг.

Фармацевтические композиции могут быть получены в виде унифицированных лекарственных форм, содержащих предварительно определенное количество активного агента согласно изобретению на дозу.

Терапевтические дозы антител согласно изобретению не оказывают заметного токсикологического эффекта *in vivo*, либо этот эффект является очень незначительным.

Композиции могут быть введены пациенту по отдельности, либо они могут быть введены в комбинации с другими агентами, лекарственными средствами или гормонами (например, они могут быть введены одновременно, последовательно или по отдельности).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела или их связывающие фрагменты согласно изобретению используют в комбинации с одним или более другими способами лечения рака, такими как, например, химиотерапия, лучевая терапия или хирургическая операция. Антитело, если оно используется вместе с химиотерапевтическим средством, может быть введено до, во время или после введения такого химиотерапевтического средства. Химиотерапия, которая может быть проведена в комбинации с введением антигенсвязывающих белков согласно изобретению, включает, но не ограничивается ею, химиотерапию с использованием алкилирующих агентов/ДНК-разрушающих агентов (например, карбоплатина, цисплатина), антиметаболитов (например, капецитабина, гемцитабина, 5-фторурацила), ингибиторов митоза (например, паклитаксела, винкристина).

Антитела, используемые для лечения различных фиброзных заболеваний, могут быть введены отдельно или в комбинации с различными другими противовоспалительными агентами.

Антитела, используемые для лечения различных воспалительных заболеваний, могут быть введены отдельно или в комбинации с различными другими антифиброзными агентами. Примером такого агента может служить перфенидон.

Доза вводимой молекулы антитела согласно изобретению зависит от природы заболевания, подвергаемого лечению, тяжести такого заболевания и от цели применения данной молекулы антитела, то есть, применяется ли данная молекула антитела для предупреждения заболевания или для лечения уже имеющегося заболевания.

Частота введения доз зависит от времени полужизни молекулы антитела в кровотоке и от продолжительности ее действия. Если молекула антитела имеет короткое время полужизни (например, от 2 до 10 часов), то может оказаться необходимым введение этой молекулы антитела в одной или более дозах в день. Альтернативно, если молекула антитела имеет длительное время полужизни (например, от 2 до 15 дней) и/или продолжительный фармакодинамический (ФД) эффект, то может оказаться необходимым введение этой молекулы один раз в день, один раз в неделю или даже 1 раз или 2 раза в месяц.

Используемый здесь термин "время полужизни" означает время пребывания молекулы в кровотоке, например, в сыворотке/плазме.

Используемый здесь термин "фармакодинамика" означает профиль, а в частности, продолжитель-

ность биологического действия молекулы согласно изобретению.

Фармацевтически приемлемый носитель, сам по себе, не должен индуцировать продуцирование антител, оказывающих негативное воздействие на индивидуума, которому вводят данную композицию, и не должен давать токсических эффектов. Подходящими носителями могут быть крупные макромолекулы с замедленным метаболизмом, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, аминокислотные сополимеры и неактивные вирусные частицы.

При этом, могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители, присутствующие в терапевтических композициях, могут также содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и/или рН-буферизующие вещества. Такие носители позволяют приготавливать фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для перорального приема пациентом.

Подходящими формами для введения являются формы, которые могут быть введены парентерально, например, путем инъекции или вливания, например, инъекции ударной дозы или непрерывного вливания. Если препарат вводят путем инъекции или вливания, то такой препарат может быть приготовлен в форме суспензии, раствора или эмульсии в маслянистом или водном носителе и может содержать технологические добавки, такие как суспендирующие агенты, консерванты, стабилизаторы и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, молекула антитела может быть приготовлена в сухой форме, которая, перед ее введением, может быть разведена соответствующей стерильной жидкостью.

Композиции согласно изобретению, после их приготовления, могут быть непосредственно введены индивидууму. Индивидуумами, подвергаемыми лечению, могут быть животные. Однако, в одном или более вариантах осуществления изобретения, указанные композиции были адаптированы для их введения человеку.

В соответствии с этим, в препаратах согласно изобретению, рН конечного препарата не равен величине изоэлектрической точки антитела или его фрагмента, например, если рН препарата равен 7, то рН этого препарата может составлять 8-9 или выше. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что, в конечном счете, полученный препарат должен обладать повышенной стабильностью, например, антитело или его фрагмент должны сохраняться в растворе в течение длительного периода времени.

В одном из примеров, фармацевтический препарат, имеющий рН в пределах от 4,0 до 7,0, включает: 1-200 мг/мл антитела согласно изобретению, 1-100 мМ буфера, 0,001-1% поверхностно-активного вещества; а) 10-500 мМ стабилизатора, б) 10-500 мМ стабилизатора и 5-500 мМ агента, придающего тоничность, или с) 5-500 мМ агента, придающего тоничность.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть введены любым способом, включая, но не ограничиваясь ими, пероральное, внутривенное, внутримышечное, внутрисуставное, интрамедулярное, интратекальное, интравентрикулярное, трансдермальное, чрескожное (например, см. WO98/20734), подкожное, внутрибрюшинное, интраназальное, внутрикишечное, местное, подъязычное, интравагинальное или ректальное введение. Для введения фармацевтических композиций согласно изобретению могут быть также использованы безыгольные шприцы. Обычно терапевтические композиции могут быть приготовлены в виде препаратов для инъекций, а именно, в виде жидких растворов или суспензий. Могут быть также приготовлены твердые формы, подходящие для их растворения или суспендирования в жидких носителях до введения инъекций.

Непосредственная доставка композиций может быть осуществлена, в основном, путем подкожной, внутрибрюшинной, внутривенной или внутримышечной инъекции, либо эти композиции могут быть введены в интерстициальное пространство ткани. Эти композиции могут быть также введены в пораженный участок. Вводимые дозы могут быть разовыми или дробными.

Следует отметить, что активным ингредиентом в композиции может быть молекула антитела. Такая молекула может подвергаться разложению в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию вводят через желудочно-кишечный тракт, то такая композиция должна содержать агенты, которые будут защищать антитело от разложения, но при этом будут способствовать высвобождению антитела после его абсорбции из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приводится в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к препарату для местного введения, включая ингаляцию.

Подходящими препаратами для ингаляции являются порошки для ингаляции, аэрозольные ингаляторы с дозирующим клапаном, содержащие газообразные пропелленты или растворы для ингаляции, не содержащие таких газообразных пропеллентов. Порошки для ингаляции согласно изобретению, содер-

жащие активное вещество, могут состоять только из вышеупомянутых активных веществ или из смеси вышеупомянутых активных веществ и физиологически приемлемого наполнителя.

Эти порошки для ингаляции могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олигосахариды и полисахариды (например, декстраны), многоатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси. При этом, обычно используются моносахариды или дисахариды, а именно, лактоза или глюкоза, в частности, но не только, в форме их гидратов.

Частицы для доставки в легкие должны иметь размер менее, чем 10 мкм, например 1-9 мкм, например от 0,1 до 5 мкм, а в частности от 1 до 5 мкм. Размер частиц активного ингредиента (такого как антигено или его фрагмент) имеет первостепенное значение.

Газообразные пропелленты, которые могут быть использованы для приготовления аэрозолей, вводимых путем ингаляции, известны специалистам. Подходящие газообразные пропелленты выбирают из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенированных углеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеупомянутые газообразные пропелленты могут быть использованы в чистом виде или в виде смесей.

Особенно подходящими газообразными пропеллентами являются галогенированные производные алкана, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из вышеупомянутых галогенированных углеводородов, особенно подходящими являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси.

Аэрозоли для ингаляции, содержащие газообразный пропеллент, могут также содержать и другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные агенты (поверхностно-активные вещества), антиоксиданты, замасливатели и pH-корректирующие агенты. Все эти ингредиенты известны специалистам.

Аэрозоли для ингаляции, содержащие газообразный пропеллент согласно изобретению, могут включать до 5 мас.% активного вещества. Аэрозоли согласно изобретению содержат, например, 0,002-5 мас.%, 0,01-3 мас.%, 0,015-2 мас.%, 0,1-2 мас.%, 0,5-2 мас.% или 0,5-1 мас.% активного ингредиента.

Альтернативно, местная доставка препарата в легкие может быть осуществлена путем введения этого препарата в виде жидкого раствора или суспензии, например, с помощью устройства, такого как аэрозольный ингалятор, например, аэрозольный ингалятор, подсоединенный к компрессору (например, аэрозольный ингалятор Pari LC-Jet Plus(R), подсоединенный к компрессору Pari Master(R) и изготовленный Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

Доставляемое антигено согласно изобретению может быть диспергировано в растворителе, например, в форме раствора или суспензии. Это антигено может быть суспендировано в соответствующем физиологическом растворе, например, в солевом растворе или в другом фармацевтически приемлемом растворителе или в забуференном растворе. Буференные растворы, известные специалистам, могут содержать от 0,05 до 0,15 мг динатрийэдетата, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды для доведения pH приблизительно от 4,0 до 5,0. Суспензия может содержать, например, лиофилизованное антигено.

Терапевтические препараты в виде суспензий или растворов могут также содержать один или более наполнителей. Наполнители хорошо известны специалистам, и такими наполнителями являются буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновая кислота, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), EDTA, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть заключены в липосомы или в биологически разлагаемые микросферы. Обычно такой препарат приготавливают в стерильной форме промышленным способом.

Этот способ может включать продуцирование и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого для приготовления препарата; асептическое суспендирование антигена в стерильном растворе, забуференном растворителем; и диспергирование препарата в стерильных резервуарах методами, известными специалистам.

Препарат для аэрозольного распыления согласно изобретению может быть приготовлен, например, в виде разовых унифицированных доз (например, содержащихся в герметично закрытых пластиковых контейнерах или сосудах), упакованных в блистерной упаковке из фольги. Каждый сосуд содержит унифицированную дозу в объеме, например, 2 мл забуференного растворителя/раствора.

Описанные здесь антигена могут быть введены с помощью аэрозольного ингалятора.

Также следует отметить, что антигено согласно изобретению может быть введено посредством генотерапии. Для достижения этой цели, последовательности ДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи молекулы антигена под контролем соответствующих компонентов ДНК, вводят пациенту так, чтобы цепи антигена экспрессировались из последовательностей ДНК и подвергались сборке *in situ*.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к применению антигена или их фрагментов в качестве реагента для диагностики, например, реагента, конъюгированного с репортерной молекулой. Таким образом, настоящее изобретение также относится к антигену или его фрагменту со-

гласно изобретению, которые являются мечеными. В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к колонке, содержащей антитело или его фрагмент согласно изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к анти-CSF-1R антителу или его фрагменту, используемым в качестве реагента для:

1) очистки белка CSF-1R (или его связывающего фрагмента), конъюгированного с матрицей и используемого на аффинной колонке, или (в случае модифицированной формы анти-CSF-1R антитела) в качестве осаждающего агента (например, в форме, модифицированной доменом, распознаваемым другой молекулой, которая может быть модифицированной), который может осаждаться, но необязательно, анти-Fc реагентом);

2) детектирования и/или количественной оценки CSF-1R на клетках или в клетках, то есть, живых или фиксированных клетках (в клетках *in vivo* или в ткани или в клеточных срезах). Такое применение может включать количественный анализ CSF-1R как биомаркера для оценки эффекта лечения анти-CSF-1R антителом. Для достижения этих целей, кандидат может быть использован в модифицированной форме (например, в форме, модифицированной путем присоединения другой молекулы; в форме генетического гибридного белка или химического конъюгата, например, полученного путем присоединения репортерной молекулы, например, флуоресцентной метки для детектирования);

3) очистки или сортировки CSF-1R-несущих клеток, меченных посредством связывания с кандидатом, модифицированными способами по пунктам (1) и (2).

В контексте настоящего описания, термин "включающий" является синонимом термина "содержащий".

Варианты осуществления изобретения, если это технически допустимо, могут быть объединены.

Описанные здесь варианты осуществления изобретения включают некоторые признаки/элементы.

Настоящее изобретение также относится к отдельным вариантам, состоящим или по существу состоящим из указанных признаков/элементов.

Технические документы, такие как патенты и заявки, вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Любые варианты осуществления настоящего изобретения, конкретно и точно цитируемые в настоящем описании, могут служить основанием для письменного отказа от любого одного или более других вариантов или их комбинаций.

Настоящее изобретение подробно описано в нижеследующих примерах, которые приводятся лишь в иллюстративных целях вместе с прилагаемым графическим материалом, описанным ниже.

На фиг. 1A-1F представлены некоторые аминокислотные и полинуклеотидные последовательности.

На фиг. 2A и 2B представлено выравнивание некоторых последовательностей.

На фиг. 3 представлена последовательность внеклеточного домена человеческого CSF-1R, кодируемая полинуклеотидом, используемым для трансфекции клеток и экспрессии белка на поверхности клеток. Эти клетки были затем использованы для иммунизации животных-хозяев.

На фиг. 4 проиллюстрировано ингибирование связывания CSF-1 с клетками THP-1 под действием антитела Ab969.

На фиг. 5а проиллюстрировано ингибирование CSF-1-индуцируемого выживания и пролиферации первичных человеческих моноцитов под действием антитела Ab969.

На фиг. 5b проиллюстрировано ингибирование IL-34-индуцируемого выживания и пролиферации первичных человеческих моноцитов под действием антитела Ab969.

На фиг. 6 проиллюстрировано ингибирование CSF-1-индуцируемого выживания и пролиферации первичных мышинных моноцитов под действием антитела Ab535.

На фиг. 7 представлены уровни CSF-1R на поверхности клеток THP-1, инкубированных с Ab969, человеческим CSF-1 и с антителом контрольного изотипа.

На фиг. 8 представлены относительные уровни CSF-1R на поверхности клеток THP-1, обработанных антителом Ab969, по отношению к уровням, наблюдаемым при обработке антителом контрольного изотипа.

На фиг. 9 представлены уровни CSF-1R на поверхности клеток RAW264.7, инкубированных с Ab535, CSF-1 и с антителом контрольного изотипа.

На фиг. 10 представлены уровни CSF-1R на поверхности клеток RAW264.7, обработанных антителом Ab535, по отношению к уровням, наблюдаемым при обработке антителом контрольного изотипа.

На фиг. 11 представлен уровень фосфорилирования CSF-1R на клетках HEK293F, трансфицированных CSF-1R после CSF-1-стимуляции или обработки антителом Ab969.

На фиг. 12 представлен уровень секреции MCP-1 из первичных человеческих моноцитов при их инкубировании с антителом Ab969 и с CSF-1.

На фиг. 13 проиллюстрирован эффект ингибирования CSF-1-опосредованного выживания моноцитов под действием гуманизованного антитела 969.g5 по сравнению с эффектом, наблюдаемым под действием химерного антитела Ab969.g0.

На фиг. 14 проиллюстрирован эффект ингибирования CSF-1-опосредованного выживания моноцитов под действием различных гуманизованных привитых антител Ab969.

На фиг. 15a представлена концентрация CSF-1 в пробах сыворотки, взятых у собакоподобных обезьян, которым была внутривенно введена разовая доза 7 мг/кг Ab969.g2.

На фиг. 15b представлена концентрация CSF-1 в пробах сыворотки, взятых у собакоподобных обезьян, которым была внутривенно введена разовая доза 1,5 мг/кг Ab969.g2.

На фиг. 15c проиллюстрировано влияние введения антитела Ab969.g2 собакоподобным обезьянам в дозах 7 мг/кг и 1,5 мг/кг на циркулирующие неклассические моноциты в различные периоды времени.

На фиг. 16 проиллюстрировано противоопухолевое действие антитела Ab535 по сравнению с действием контрольного антитела, положительного контроля и контроля-носителя у иммунодефицитных "голых" мышей, несущих подкожные ксенотрансплантаты MCF-7 человеческой раковой опухоли молочной железы.

На фиг. 17 проиллюстрировано противоопухолевое действие антитела Ab535 по сравнению с действием контрольного антитела, положительного контроля и контроля-носителя у ортотопической модели РС-3 рака предстательной железы.

На фиг. 18a проиллюстрировано влияние лечения индуцированного блеомицином фиброза легких антителом Ab535 на концентрацию коллагена BALF по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 18b проиллюстрировано влияние лечения индуцированного блеомицином фиброза легких антителом Ab535 на фиброзное поражение образцов легких, оцененное по шкале Эшкрофта, по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 18c проиллюстрировано влияние лечения индуцированного блеомицином фиброза легких антителом Ab535 на концентрацию альбумина в сыворотке по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 18d указано число макрофагов в физиологической жидкости BAL у мышей с экспериментальным индуцированным блеомицином фиброзом легких, и на этой фигуре показано, что лечение индуцированного блеомицином фиброза легких антителом Ab535 приводило к снижению числа макрофагов в физиологической жидкости BAL по сравнению с числом макрофагов у животных, обработанных антителом контрольного изотипа. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. ош.; * означает значимое отличие от обработки антителом контрольного изотипа и физиологическим раствором; # означает значимое отличие от обработанных блеомицином мышей, которым вводили дозу антитела контрольного изотипа ($p < 0,05$).

На фиг. 19 представлены репрезентативные изображения, полученные при гистопатологическом анализе легких животных, обработанных контрольным физиологическим раствором, блеомицином в комбинации с антителом контрольного изотипа и блеомицином в комбинации с антителом Ab535.

На фиг. 20a проиллюстрировано влияние лечения ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 на концентрацию коллагена BALF по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 20b проиллюстрировано влияние лечения ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 на фиброзное поражение образцов легких, оцененное по шкале Эшкрофта, по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 20c проиллюстрировано влияние лечения ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 на концентрацию альбумина в сыворотке по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 20d указано число макрофагов в физиологической жидкости BAL у ADA-дефицитных мышей с моделью фиброза легких, и на этой фигуре показано, что лечение ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 приводило к снижению числа макрофагов в физиологической жидкости BAL.

На фиг. 21 представлены репрезентативные изображения, полученные при гистопатологическом анализе легких нормальных мышей (ADA⁺) и ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких (ADA⁻), обработанных антителом контрольного изотипа или антителом Ab535.

Примеры

Пример 1. Продуцирование анти-CSF-1R антитела.

Иммунизация.

Самок крыс Sprague Dawley иммунизировали сингенными крысиными фибробластами RFL6, которые были транзистентно трансфицированы вектором, экспрессирующим внеклеточный домен человеческого CSF-1R, связанный с гликозилфосфатидинозитным (GPI) якорем. На фиг. 3 показана SEQ ID NO: 39, которая представляет собой последовательность внеклеточного домена человеческого CSF-1R, используемую для иммунизации крыс.

Крыс иммунизировали путем введения пяти подкожных инъекций $3-9 \times 10^6$ трансфицированных клеток на животное с интервалами в три недели. В участок, находящийся рядом с участком первой клеточной иммунизации, инъецировали полный адьювант Фрейнда (50% в PBS). Через две недели после последней иммунизации собирали мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и удаляли селе-

зенку.

Первый скрининг супернатантов антител.

Супернатанты антител сначала скринировали на их способность связываться с человеческим CSF-1R, экспрессируемым на трансфицированных клетках HEK293, методом флуоресцентного анализа для определения микрообъема (FMAT).

При первом FMAT-скрининге 600×96-луночных планшетов было идентифицировано 1000 лунок с анти-CSF-1R активностью. В целом, приблизительно 3×10^8 В-клеток (урьсинных спленоцитов) скринировали на продуцирование CSF-1R-связывающих антител с помощью FMAT.

Второй скрининг супернатантов антител.

Анализ нескольких сотен образцов проводили для идентификации FMAT-положительных лунок, которые содержали нейтрализующие анти-CSF-1R антитела, то есть, антитела, обладающие способностью предотвращать связывание человеческого CSF-1 с рецептором человеческого CSF-1R. Супернатанты антитела инкубировали с CSF-1R-экспрессирующими клетками THP-1, а затем с человеческим CSF-1. Уровень связывания CSF-1 с клетками THP-1 измеряли с помощью проточной цитометрии, проводимой с использованием поликлонального анти-CSF-1 антитела. В качестве отрицательного контроля использовали супернатанты иррелевантных антител.

Второй скрининг проводили для супернатантов в 779 лунках с антителом, и 88 из этих лунок продемонстрировали детектируемую CSF-1-блокирующую активность.

Третий скрининг супернатантов антител.

Супернатанты антител, которые обнаруживали нейтрализующую активность во втором скрининге, были протестированы на их способность подавлять CSF-1-зависимое выживание первичных человеческих моноцитов. Моноциты очищали от клеток крови, и 1×10^4 клеток инкубировали с супернатантом каждого антитела в присутствии 20 нг/мл человеческого CSF-1. После инкубирования в течение 72 ч, число жизнеспособных моноцитов определяли с помощью анализа CellTiter Glo.

Третий скрининг проводили для супернатантов в 59 лунках с антителом, идентифицированных во втором скрининге, и 18 из этих лунок продемонстрировали способность снижать уровень CSF-1-опосредуемого выживания моноцитов.

Клонирование переменных областей антитела и повторный анализ на блокирующую активность.

Была предпринята попытка клонировать переменную область (V-область) антитела в 18 лунках с антителами, обладающими CSF-1-нейтрализующей активностью. V-области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к константным областям крысиного антитела, и с использованием избыточной серии праймеров, которые гибридизовались с последовательностями, кодирующими лидерные пептиды крысиного иммуноглобулина. От 14 антител были получены гены V-областей, которые были клонированы в векторы, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи человеческого IgG4.

Пары векторов антител транзитивно переносили в клетки HEK293F, и кондиционированную среду тестировали на CSF-1-нейтрализующую активность на клетках THP-1 (как описано выше). Девять антител обладали способностью к частичному или полному ингибированию связывания с CSF-1 по сравнению со степенью ингибирования, наблюдаемой в контрольной кондиционированной среде.

Анализ последовательностей девяти нейтрализующих анти-CSF-1R антител.

Девять нейтрализующих антител были секвенированы для оценки разнообразия их последовательностей. Все эти девять антител были уникальными. Эти антитела клонировали и экспрессировали для проведения дополнительных исследований по определению их свойств.

Пример 2. *In vitro* свойства химерного антитела Ab969 против человеческого CSF-1R и антитела Ab535 против мышинового CSF-1R.

i) Экспрессия химерного антитела Ab969.

Переменные области девяти нейтрализующих антител, идентифицированных как описано в примере 1, клонировали в отдельные векторы, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи, и экспрессировали в виде полноразмерных человеческих антител IgG4.

Гены VH клонировали в вектор pVhg4FL(V19H), который содержит ДНК, кодирующую природную лидерную последовательность и константную область тяжелой цепи гамма-4 человеческого антитела с мутацией S241P, стабилизирующей шарнирную область. Гены VL (каппа) клонировали в вектор pKH10.1(V4L), который содержит ДНК, кодирующую природную лидерную последовательность и константную область каппа-цепи человеческого антитела (аллотипа Km3).

Антитела экспрессировали путем транзитивной котрансфекции соответствующих пар векторов тяжелой и легкой цепей в клетки CHO-K1. Очистку антител в PBS, pH 7,4, осуществляли так, чтобы уровень агрегатов в конечном препарате составлял менее 1%.

Панель из девяти антител включала антитело, обозначенное как антитело 969. Это химерное антитело, содержащее крысиные переменные области, константную область тяжелой цепи гамма-4 человеческого антитела и константную область каппа-цепи человеческого антитела, обозначено в последующих примерах как антитело 969 или антитело 969cHcL или антитело 969.g0.

ii) Анализ на блокирование связывания с лигандом.

Способность каждого из этих девяти антител ингибировать связывание CSF-1 с клетками THP-1 оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки THP-1 инкубировали с каждым антителом в концентрациях 0,5, 0,125, 0,031, 0,0078 и 0,00195 мкг/мл в течение 30 мин. Иррелевантное антитело IgG4 служило в качестве антитела контрольного изотипа. После промывки, клетки инкубировали с 0,5 мкг/мл человеческого CSF-1 в течение 30 мин. После дополнительной промывки, связанный CSF-1 детектировали путем последовательного инкубирования с биотинилированным анти-CSF-1 антителом и с Alexa488-конъюгированным стрептавидином. Количество связанного с рецептором лиганда определяли с помощью проточной цитометрии, и строили график по данным средней интенсивности флуоресценции (MFI).

В этом анализе было идентифицировано четыре антитела, включая Ab969, которые значительно превосходили остальные протестированные антитела по их способности полностью ингибировать связывание с CSF-1 при концентрации 31,3 нг/мл. Результаты для Ab969 представлены на фиг. 4.

iii) Ингибирование CSF-1- и IL-34-опосредуемого выживания моноцитов.

Антитело против человеческого CSF-1R.

Очищенные антитела против человеческого CSF-1R тестировали на способность ингибировать CSF-1- и IL-34-индуцируемое выживание и пролиферацию первичных человеческих моноцитов. В каждом анализе, митоген (CSF-1 или IL-34) использовали в концентрации, которая обеспечивала максимальную стимуляцию моноцитов.

Человеческие МКПК приготавливали из свежей человеческой цельной крови в градиента Фиколла, а моноциты очищали путем негативного отбора. Моноциты инкубировали с 0,25 мкг/мл антитела и 20 нг/мл CSF-1 в течение 72 часов, и относительное число жизнеспособных клеток определяли с помощью анализа CellTiter Glo. Данные считывания люминесценции коррелировали с числом жизнеспособных клеток. Результаты представлены на фигуре 5a.

Человеческие МКПК приготавливали из свежей человеческой цельной крови в градиента Фиколла, а моноциты очищали путем негативного отбора. Моноциты инкубировали с 0,25 мкг/мл антитела и 20 нг/мл IL-34 в течение 72 часов, и относительное число жизнеспособных клеток определяли с помощью анализа CellTiter Glo. Данные считывания люминесценции коррелировали с числом жизнеспособных клеток. Результаты представлены на фиг. 5b.

Четыре из этих антител, включая Ab969, продемонстрировали, наряду с их лиганд-блокирующей активностью, превосходное ингибирование выживания моноцитов по сравнению с остальными антителами при стимуляции антигенами CSF-1 (фиг. 5a) и IL-34 (фиг. 5b).

Антитело против мышинового CSF-1R.

Первичные мышинные CD11b⁺-моноциты выделяли из мышинной селезенки. Затем моноциты инкубировали с титруемым мышинным CSF-1 (mCSF-1) в течение 24 ч. Высвобождение MCP-1 в клеточную среду оценивали с помощью анализа ELISA, который указывал на дозозависимое высвобождение MCP-1 под действием mCSF-1. В отдельной части данного исследования добавляли 10 мкг/мл антитела Ab535 против мышинового CSF-1R и проводили титрование с использованием mCSF-1. Высвобождение MCP-1 полностью ингибировалось антителом Ab535 при всех концентрациях тестируемых CSF-1 (фиг. 6).

Анализ на высвобождение MCP-1 осуществляли с использованием первичных мышинных моноцитов при постоянной концентрации CSF-1 100 нг/мл и при титровании антителом Ab535. В результате этого анализа было выявлено дозозависимое ингибирование высвобождения MCP-1 и была вычислена IC₅₀. Как было определено в двух независимых экспериментах, средняя IC₅₀ для Ab535 составляла 8,08 нг/мл.

Выводы. CSF-1-обработка мышинных моноцитов приводила к дозозависимому высвобождению MCP-1, которое полностью ингибировалось при введении 10 мкг/мл Ab535. Антитело Ab535 ингибировало CSF-1-индуцируемое дозозависимое высвобождение MCP-1 из мышинных моноцитов при средней IC₅₀ 8,08 нг/мл (n=2). Величина IC₅₀ была аналогична величине, полученной при использовании антител против человеческого CSF-1R.

iv) Аффинность.

Антитела тестировали на их способность связываться с CSF-1R в анализе BIAcore, проводимом путем оценки кинетики связывания с очищенным рекомбинантным гибридным белком CSF-1R/Fc.

Анализ проводили в формате захвата анти-CSF-1R антител иммобилизованным F(ab')₂ против человеческого IgG с последующим титрованием hCSF-1R/Fc по поверхности захвата. Анализ BIA (Biomolecular Interaction Analysis) осуществляли с использованием BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Все эксперименты осуществляли при 25°C. Аффинно очищенный F(ab')₂-Фрагмент, специфичный к козьему антителу против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) посредством химического связывания с амином до получения единиц отклика (RU)-5000. Буфер HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% поверхностно-активного вещества P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) использовали в качестве рабочего буфера со скоростью потока 10 мкл/мин. Впрыскивание анти-CSF-1R антитела осуществляли до достижения степени захвата приблизительно на уровне 100 RU на F(ab')₂-Фрагменте иммобилизованного антитела против человеческого IgG.

Рекомбинантный человеческий CSF-1R/Fc (R&D Systems) пропускали через иммобилизованное ан-

ти-CSF-1R антитело при 5 нМ и со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 5 мин, а затем скоростью потока увеличивали до 100 мкл/мин и проводили фазу диссоциации в течение 30 мин. Впрыскивание при концентрации 5 нМ осуществляли два раза вместе с соответствующим буферным контролем. Эти сенсорграммы были использованы для вычисления скорости диссоциации. Рекомбинантный человеческий CSF-1R/Fc титровали с использованием иммобилизованного анти-CSF-1R антитела при 2,5 нМ и со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 5 мин, а затем в течение 10 мин для проведения фазы диссоциации. Эти сенсорграммы были использованы для вычисления скорости ассоциации. Поверхность регенерировали со скоростью потока 10 мкл/мин путем впрыскивания 10 мкл 40 мМ HCl, а затем 5 мкл 10 мМ NaOH. Кривые, построенные по данным связывания с вычитанием двойного значения фона, были проанализированы с использованием компьютерной программы BIAevaluation Double (version 4.1) в соответствии со стандартными процедурами. Кинетические параметры определяли с помощью алгоритма подбора кривой.

Три из четырех протестированных антител имели аффинность (K_D) менее, чем 10 пМ. Эта аффинность превышала аффинность связывания параллельно используемого реагента с антителом против мышиного CSF-1R, Ab535. Результаты для Ab969 и Ab553 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Антитело	Константа ассоциации K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	Константа диссоциации K_d (s^{-1})	Аффинность K_D (M)	Аффинность K_D (пМ)
Ab969	$2,58 \times 10^6$	$2,49 \times 10^{-5}$	$9,65 \times 10^{-12}$	9,6
Ab535	$2,24 \times 10^6$	$1,06 \times 10^{-5}$	$4,73 \times 10^{-12}$	4,7

Аффинность антител также оценивали в клеточном анализе с использованием клеток THP-1. Эти антитела неосредственно метили флуоресцентным красителем Alexa-488, и аффинность измеряли с помощью количественной проточной цитометрии. Дополнительный анализ BIAcore подтвердил, что флуоресцентное конъюгирование антител не приводило к изменению аффинности связывания с рекомбинантным белком CSF-1R. Результаты представлены в табл. 2.

Абсолютные величины аффинности, полученные с применением этих двух методов, отличались друг от друга, и такое различие обычно наблюдалось при сравнении двух систем. Однако, анализ с использованием клеток показал, что эти антитела связывались с CSF-1R с высокой аффинностью.

Таблица 2

Антитело	Клеточная аффинность $K_D \pm$ ср. кв. ош. (нМ)	Аффинность BIAcore K_D (пМ)
Ab969	$2,20 \pm 0,19$	4,80

v) Ингибирование связывания с CSF-1 (IC_{50}).

Четыре антитела анализировали путем определения их относительной активности ингибирования связывания CSF-1 с клетками THP-1. В анализе этого формата, все четыре антитела оказывали сильное ингибирующее действие на связывание с CSF-1 при величинах IC_{50} менее, чем 5 нг/мл (~30 пМ).

Таблица 3

Антитело	Средняя $IC_{50} \pm$ ср. кв. ош. (нг/мл)
Ab969	$2,89 \pm 1,22$

vi) Перекрестная реактивность антитела.

Четыре антитела тестировали на перекрестную реактивность с полноразмерным CSF-1R макак-резусов, собакоподобных обезьян и собак. Все эти четыре антитела связывались с CSF-1R макак-резусов и собакоподобных обезьян, а также с человеческим CSF-1R, что ясно указывало на то, что такой уровень связывания значительно превышал уровень связывания с антителом контрольного изотипа.

Таблица 4

Антитело	Перекрестная реактивность		
	Собакоподобные обезьяны	Макак-резусы	Собаки
Ab969	Да	Да	Нет

vii) Интернализация CSF-1R.

Ab969

Клетки THP-1 инкубировали с Ab969 в течение 0, 0,5, 2, 4, 24 и 48 ч. Эти клетки также обрабатывали человеческим CSF-1 и антителом контрольного изотипа, которые служили в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. В каждый период времени измеряли уровень CSF-1R на поверхности клеток с помощью проточной цитометрии (фиг. 7). Относительный уровень CSF-1R на по-

верхности клеток, обработанных антителом Ab969, сравнивали с уровнем, определенным с использованием антитела контрольного изотипа, и результаты были представлены на фиг. 8.

Обработка клеток ТНР-1 рекомбинантным CSF-1 приводила к быстрому и устойчивому снижению уровня CSF-1R на поверхности клеток; стимулировала связывание природного лиганда с его когнатным рецептором и индуцировала интернализацию комплекса "лиганд-рецептор".

Клетки ТНР-1, обработанные антителом Ab969, обнаруживали более высокие уровни экспрессии CSF-1R на своей поверхности по сравнению с уровнями экспрессии, наблюдаемой на необработанных клетках ТНР-1 и на клетках ТНР-1, обработанных антителом контрольного изотипа, в течение всех 48 ч. Эти данные со всей очевидностью позволяют предположить, что обработка клеток ТНР-1 антителом Ab969 не индуцировала интернализацию hCSF-1R, экспрессируемого на поверхности клеток, в течение 48 ч после обработки.

По истечении определенного периода времени наблюдалось заметное увеличение уровня экспрессии CSF-1R на поверхности необработанных и обработанных клеток ТНР-1, за исключением клеток, обработанных CSF-1. Это может быть обусловлено изменениями уровней экспрессии во время клеточного роста за 48-часовой период проведения эксперимента, и, возможно, представляет собой ответ на стрессовые условия.

Для того, чтобы дополнительно подтвердить, что Ab969 не индуцирует интернализацию рецептора, а также для того, чтобы исключить возможность присутствия физиологически нерелевантной клеточной линии ТНР-1, в анализе на интернализацию были также использованы первичные человеческие моноциты. Данные, полученные в этом анализе, также продемонстрировали, что Ab969 не вызывало быструю интернализацию CSF-1R на поверхности нормальных первичных человеческих моноцитов.

Ab535.

Моноцитарная/макрофагальная клеточная линия мышинного лейкоза RAW264.7 экспрессирует высокие уровни мышинного CSF-1R (mCSF-1R) и представляет собой подходящую клеточную систему для определения способности антитела Ab535 против мышинного CSF-1R индуцировать интернализацию рецептора.

Клетки RAW264.7 инкубировали с Ab535 в течение 0, 0,5, 2, 4, 24 и 48 ч. Эти клетки также обрабатывали человеческим CSF-1 и антителом контрольного изотипа, которые служили в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. В каждый период времени измеряли уровень CSF-1R на поверхности клеток с помощью проточной цитометрии (фиг. 9). Относительный уровень CSF-1R на поверхности клеток сравнивали с уровнем, определенным с использованием антитела контрольного изотипа, и результаты были представлены на фиг. 10.

Эти данные показали, что обработка клеток ТНР-1 рекомбинантным CSF-1 приводила к быстрому и устойчивому снижению уровня CSF-1R на поверхности клеток.

На клетках RAW264.7, обработанных человеческим CSF-1 в течение 2 ч, наблюдалось явное снижение уровней mCSF-1R на поверхности клеток по сравнению с уровнем, наблюдаемым для необработанных клеток и клеток, обработанных антителом контрольного изотипа. Такое снижение поддерживалось в течение 48 часов проведения исследования. В результате было продемонстрировано, что человеческий CSF-1 индуцирует интернализацию mCSF-1R, и было подтверждено, что такая экспериментальная система является подходящей для мониторинга интернализации рецептора.

Клетки RAW264.7, обработанные антителом Ab535, обнаруживали такие же уровни mCSF-1R клеточной поверхности, как и необработанные клетки и клетки, обработанные антителом контрольного изотипа, в течение 48 ч проведения эксперимента. Поскольку предполагалось, что в этот период времени будет наблюдаться антитело-опосредуемая интернализация рецептора, то эти данные со всей очевидностью позволяют предположить, что Ab535 не индуцирует интернализацию mCSF-1R.

Для того, чтобы дополнительно подтвердить, что Ab535 не индуцирует интернализацию рецептора, в анализе на интернализацию были также использованы первичные мышинные CD11b⁺-моноциты-макрофаги. Полученные результаты также продемонстрировали, что обработка мышинных моноцитов-макрофагов антителом Ab535 не приводила к интернализации CSF-1R, экспрессируемого на поверхности клеток, в течение 24 ч после обработки.

viii) Активация CSF1-R.

CSF-1 связывается с CSF-1R, что приводит к образованию димеров рецепторов и к быстрому индуцированию фосфорилирования рецептора посредством тесного контактирования киназных доменов. Это приводило к интернализации рецептора и к активации некоторых хорошо охарактеризованных путем передачи сигнала, включая путь Ras-MAPK. Возможно, что анти-CSF-1R антитело может индуцировать кластеризацию рецепторов и запуск последующего каскада реакций передачи сигнала. Это может оказаться нежелательным фактором для антитела, которое должно ингибировать передачу сигнала рецептора, а поэтому был проведен тест на активацию рецептора антителом Ab969 в двух независимых форматах анализа *in vitro*.

В анализе первого формата антитела инкубировали с клетками, трансфицированными человеческим полноразмерным CSF-1R, и мониторинг фосфорилирования рецептора и молекул последующей передачи сигнала проводили с помощью вестерн-блот-анализа.

Клеточная линия THP-1 представляет собой исходную точку для мониторинга статуса активации CSF-1R. Однако уровень экспрессии CSF-1R в этой клеточной линии является относительно низким, что затрудняет проведение биохимического анализа. Поэтому, экспрессионная система была разработана так, чтобы можно было с высокой степенью достоверности детектировать уровень фосфорилирования CSF-1R. Фосфорилирование CSF-1R может быть детектировано по двум тирозиновым остаткам, Y723 и Y809. Кроме того, фосфорилирование p44/42 MAPK (Erk1/2) в положениях T202 и Y204 определяли как независимое считывание активности CSF-1R. Во всех экспериментах, CSF-1-стимуляция служила в качестве положительного контроля.

Клетки HEK293F были трансфицированы плазмидным вектором, экспрессирующим полноразмерный CSF-1R. После инкубирования в течение 24 ч в отсутствие сыворотки, клетки стимулировали 100 мкг/мл и титровали с использованием 0,001 мкг/мл антитела Ab969.g0 в течение 5 мин. Клетки также обрабатывали 500 нг/мл рекомбинантного CSF-1, который служил в качестве положительного контроля. Необработанные клетки служили в качестве отрицательного контроля. Лизаты белков, выделенные из обработанных и необработанных клеток, разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с DCH и подвергали блоттингу на нитроцеллюлозе. Вестерн-иммуноблоттинг осуществляли с использованием антител против фосфо-Y723 CSF-1R (Cell Signaling Technology #3151), против фосфо-Y809 (Cell Signaling Technology #3154), против всех CSF-1R (Cell Signaling Technology #3152) и против фосфо-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (Cell Signaling Technology #5301).

Нестимулированные CSF-1R-трансфицированные клетки HEK293F имели низкий базальный уровень фосфорилирования CSF-1R. CSF-1-стимуляция клеток давала уровень фосфорилирования CSF-1R в положениях остатков Y723 и Y809, который может быть легко обнаружен с помощью вестерн-блот-анализа (фиг. 11). Также наблюдалась заметная стимуляция фосфорилирования ERK1/2 после CSF-1-обработки. Обработка трансфицированных клеток HEK293F антителом Ab969.g0 не стимулировала фосфорилирование CSF-1R или не усиливала активацию ERK1/2.

Во втором анализе антитело Ab969 (мономерное и перекрестно-связанное) инкубировали с первичными человеческими моноцитами, и секрецию MCP-1 использовали в качестве маркера активации CSF-1R. CSF-1-обработка человеческих моноцитов приводила к высвобождению ими белка-1, который является хемоаттрактантом моноцитов (MCP-1). Если анти-CSF-1R антитела обладали способностью активировать рецептор CSF-1R на моноцитах, то наблюдалось ожидаемое высвобождение MCP-1.

В описанных ранее биохимических анализах использовали только мономерное анти-CSF-1R антитело. Однако возможно, что перекрестно-связанный IgG1 обладает повышенной способностью к тесному контактированию с молекулами CSF-1R и к индуцированию фосфорилирования тирозина и последующей передачи сигнала. Для оценки этого свойства, анализ на MCP-1 также осуществляли с использованием антитела Ab969.g0, которое перекрестно связывалось с антителом против человеческого Fc.

Человеческие моноциты выделяли из цельной человеческой крови следующим образом: 60-100 мл человеческой крови собирали в пробирки BD Vacutainer, содержащие 10 мл литий-гепарина 171 IU. Кровь распределяли по 3-4 пробиркам Leucoser с фиколлом (Greiner Bio-One) и покрывали PBS. Пробирки центрифугировали при 1000×g и при 20°C в течение 10 мин без перерыва, и собирали слой МКПК. Клетки осаждали, а затем выделяли моноциты с использованием сфер, содержащих человеческий CD14 для положительного отбора (Miltenyi Biotec 130-050-201) в соответствии с инструкциями производителей. Антитело Ab969.g0 перекрестно связывали путем добавления Fc-фрагмента козьего антитела против человеческого IgG (R&D Systems G-102-C) в отношении Ab969.g0:Fc=2:1. Моноциты высевали при плотности 20000 клеток на лунку в среду в присутствии титруемой дозы антитела Ab969.g0 или перекрестно-связанного Ab969.g0 (при полулогарифмическом серийном разведении с получением 16 концентраций, максимум 10 мкг/мл). Контрольными лунками были лунки, которые не содержали антитела, лунки, в которых отсутствовал CSF-1 или присутствовал CSF-1 в концентрации 100 нг/мл CSF-1, и лунки, в которых отсутствовало антитело против человеческого Fc или присутствовало это антитело (в концентрации, равной максимальной концентрации антитела Ab969.g0 (5 мкг/мл)). Клетки инкубировали в течение 24 ч, а затем планшеты центрифугировали для осаждения клеток, и супернатант собирали. Секретированный MCP-1 оценивали по MSD (K151AYB-2) в соответствии с инструкциями производителей.

Результаты эксперимента представлены в табл. 12. Какого-либо увеличения уровней MCP-1 не было зарегистрировано при обработке любым антителом, как мономерным, так и перекрестно-связанным, причем, концентрация MCP-1 в среде обработанных клеток была идентична концентрации MCP-1 в среде необработанных клеток. Как и ожидалось, клетки, обработанные CSF-1, обнаруживали значительное и репродуцируемое увеличение уровней MCP-1.

Пример 3. Гуманизация антитела 969 и отбор гуманизованного привитого антитела.

Четыре анти-CSF-1R антитела отбирали для гуманизации исходя из их аффинности и свойств, определенных в примере 2.

i) Получение гуманизованных привитых антител.

Антитела 969 и 970 гуманизовали путем присоединения CDR V-областей крысиного антитела к каркасным областям V-области антитела человеческой зародышевой линии.

Донорные CDR, присоединенные к акцепторной последовательности, были пронумерованы по Кэ-

бату (Rabat et al., 1987), за исключением CDR-H1, которая была пронумерована по комбинированной системе нумерации Чотия/Кэбата (см. Adair et al., 1991 Humanised antibodies. WO91/09967).

Человеческая V-область VK1 2-1-(1) 012 плюс J-область JK4 (V. BASE, <http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk>) была выбрана в качестве акцептора для CDR легкой цепи. Человеческая V-область VH2 3-1 2-70 плюс J-область JH3 (V BASE, <http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>) была выбрана в качестве акцептора для CDR тяжелой цепи.

В гуманизованных последовательностях, число каркасных остатков V-областей крысиного антитела сохранялось, как указано в табл. 1.

Гены, кодирующие исходные последовательности V-области легкой и тяжелой цепей гуманизованного антитела, обозначенные gL1 и gH1, соответственно, были смоделированы и сконструированы методом автоматического синтеза. Другие варианты V-областей легкой и тяжелой цепей были созданы путем модификации генов gL1 и gH1 посредством олигонуклеотид-направленного мутагенеза.

Гены VK (gL1-gL9) клонировали в экспрессионный вектор человеческой легкой цепи рKH10.1, содержащий ДНК, кодирующую константную область человеческой каппа-цепи (аллотипа Km3). Гены VH (gH1 и gH2) клонировали в экспрессионный вектор человеческой тяжелой цепи гамма-4 человеческого антитела рVhD4P FL, который содержит ДНК, кодирующую константную область тяжелой цепи гамма-4 человеческого антитела с мутацией S241P, стабилизирующей шарнирную область (Angal et al., 1993, Mol. Immunol. 30:105-8). Различные комбинации плазмид, кодирующих варианты легкой и тяжелой цепей, котрансфецировали в клетки НЕК293F, в которых затем экспрессировались гуманизованные рекомбинантные антитела 969.

Другие три анти-CSF-1R антитела также гуманизировали путем присоединения консервативных областей, содержащих определенное число донорных остатков в тяжелой и легкой цепях, которые, как было предсказано, являются особенно важными, и путем присоединения полностью гуманизованных привитых областей, не содержащих донорных остатков.

ii) Аффинность гуманизованных антител.

Каждое гуманизованное привитое антитело оценивали на (i) аффинность связывания с человеческим CSF-1R с помощью анализа BIAcore и (ii) по температуре плавления (T_m), измеренной с помощью анализа ThermoFluor, и эти результаты сравнивали с результатами, полученными для родительского химерного антитела. Очевидно, что температура плавления является ранним показателем стабильности молекулы антитела, причем, нестабильные антитела обычно имеют T_m менее, чем 75,0°C.

Привитые антитела, представляющие собой антитела на промежуточных стадиях гуманизации Ab969, представлены в табл. 5. В табл. 5 также представлено химерное антитело Ab696 (969сHcL). Консервативное привитое антитело (969gH1gL1) имеет константу аффинности (K_D) 2,4 пМ, а поэтому, очевидно, что оно не теряет свою аффинность, в отличие от аффинности химерного крысиного антитела (969сHcL). T_m консервативного привитого антитела 969gH1gL1 составляет 78,8°C, что превышает пороговую величину 75,0°C. Замена донорного остатка A78 на V78 в тяжелой цепи приводит к продуцированию антитела 969gH2gL1, аффинность которого не снижается ($K_D=2,3$ пМ). После поэтапной замены донорных остатков K38, Y71 и F87 на остатки Q38, F71 и Y87, соответственно, аффинность не изменяется. Конечное гуманизованное привитое антитело 969gH2gL8, не содержащее донорных остатков, имеет аффинность, аналогичную аффинности родительского химерного антитела (4,1 пМ).

Таблица 5

Привитое антитело	Донорные остатки VK	Донорные остатки VH	k_a ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D (пМ)
969сHcL	N/A	N/A	2.31E+06	7.99E-06	3.5
969gH1gL1	K38, Y71, F87	A78	2.04E+06	5.00E-06	2.4
969gH1gL2	Y71, F87	A78	1.46E+06	5.00E-06	3.4
969gH1gL3	K38, F87	A78	1.80E+06	5.00E-06	2.8
969gH1gL4	K38, Y71	A78	2.39E+06	5.00E-06	2.1
969gH1gL5	F87	A78	9.26E+05	6.11E-06	6.6
969gH1gL6	K38	A78	1.15E+06	5.00E-06	4.4
969gH1gL7	Y71	A78	1.50E+06	5.00E-06	3.3
969gH1gL8	-	A78	1.17E+06	5.00E-06	4.3
969gH2gL1	K38, Y71, F87	-	2.27E+06	5.23E-06	2.3
969gH2gL2	Y71, F87	-	1.78E+06	6.11E-06	3.4
969gH2gL3	K38, F87	-	2.12E+06	7.29E-06	3.4
969gH2gL4	K38, Y71	-	2.20E+06	9.64E-06	4.4
969gH2gL5	F87	-	7.68E+05	5.00E-06	6.5
969gH2gL6	K38	-	1.40E+06	6.23E-06	4.4
969gH2gL7	Y71	-	1.40E+06	5.00E-06	3.6
969gH2gL8	-	-	1.23E+06	5.00E-06	4.1

Ab969 имеет потенциальный мотив изомеризации DG на стыке CDR-L2 и каркасной области. Этот

остаток аспарагиновой кислоты сайта DG в привитых антителах 969gH2gL7 и 969gH2gL8 был заменен серином с получением инертной последовательности SG. Аффинность по отношению к CSF-1R измеряли с помощью анализа ВІАсоге, и в этом анализе не было зарегистрировано какой-либо потери аффинности (табл. 6). Кроме того, конечные привитые антитела 969H2gL7(SG) и 969gH2gL8(SG) сохраняли высокую T_m , составляющую 80,5 и 79,9°C, соответственно.

Таблица 6

Привитое антитело	Донорные остатки VK	Донорные остатки VH	k_a ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D (нМ)
969cHcL	N/A	N/A	4.35E+06	8.53E-06	2.0
969gH2gL7 DG	Y71	-	2.56E+06	7.16E-06	2.8
969gH2gL7 SG	Y71	-	2.54E+06	5.00E-06	2.0
969gH2gL8 DG	-	-	2.18E+06	5.00E-06	2.3
969gH2gL8 SG	-	-	3.22E+06	5.00E-06	1.6

В результате гуманизации антитела Ab969 и одного другого анти-CSF-1R антитела Ab970 были получены полностью гуманизованные антитела (не содержащие крысиных донорных остатков) с аффинностью (K_D), эквивалентной аффинности родительского химерного антитела, и с T_m , которая является первым признаком стабильности молекулы. Полностью гуманизованный вариант антитела Ab969 (969gH2gL8 SG) был переименован в Ab969.g5. Исходя из этого, химерный вариант антитела Ab969 был обозначен Ab969.g0.

Аффинность очищенных химерных и гуманизованных привитых антител Ab969 по отношению к рекомбинантному CSF-1R также измеряли с помощью анализа ВІАсоге. Описанные ранее эксперименты по гуманизации методом ВІАсоге осуществляли с использованием неочищенных клеточных супернатантов вместо очищенного антитела. При этом было детектировано небольшое снижение аффинности, а величины K_D повышались приблизительно с 4 до 5 нМ.

Таблица 7

Антитело	Эксперимент	k_a ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D (нМ)
969.g0	1	2.16E+06	9.49E-06	4.4
	2	2.16E+06	9.10E-06	4.2
	Среднее	2.16E+06	9.30E-06	4.3
969.g5	1	1.63E+06	8.13E-06	5.0
	2	1.50E+06	7.96E-06	5.3
	Среднее	1.57E+06	8.05E-06	5.1

iii) Ингибирование CSF-1-опосредуемого выживания моноцитов под действием антител Ab969.g0 и Ab969.g5

CSF-1 необходим для активации и выживания моноцитов в культуре, а в случае удаления CSF-1, моноциты быстро подвергаются апоптозу. Был разработан анализ, в котором используется MCP-1 (монокитарный хемотаксический белок-1, также известный как CCL2, лиганд 2 мотива хемокина C-C 2) в качестве считываемой информации. После CSF-1-стимуляции, человеческие моноциты секретируют MCP-1, который может быть детектирован в клеточном супернатанте с помощью ELISA, обычно через 24 ч после стимуляции. Ингибирование передачи CSF-1R-сигнала антителами, которые блокируют связывание с CSF-1, приводит к снижению секреции MCP-1.

Человеческие МКПК были получены из свежей человеческой цельной крови в градиенте фикола и CD14⁺-моноцитов, очищенных путем положительного отбора. Все 2×10^4 моноцитов инкубировали с полупологарифмическим серийным разведением от 10 мкг/мл до 0,35 пг/мл антитела в присутствии 100 нг/мл человеческого CSF-1 в течение 24 ч. Контроль, "не содержащий ни антитела, ни CSF-1", и контроль, "не содержащий антитела, но содержащий CSF-1", был включен для получения величин минимального и максимального высвобождения MCP-1. После 24-часового инкубирования, клетки осаждали путем центрифугирования, и супернатант собирали. Концентрацию MCP-1 измеряли с помощью анализа ELISA человеческого CCL2/MCP-1 DuoSet (R&D Systems DY279) в соответствии с инструкциями производителей.

Исходя из всего вышесказанного, этот анализ можно назвать "анализом на ингибирование MCP-1".

Анализ на ингибирование MCP-1 проводили для сравнения активности гуманизованного антитела 969.g5 с активностью химерного антитела Ab969.g0. Было проведено пять независимых анализов с использованием четырех различных доноров моноцитов. Во всех анализах, гуманизованное привитое антитело Ab969.g5 неожиданно обнаруживало значительно более низкую активность по сравнению с активностью родительского химерного антитела 969.g0. Один репрезентативный эксперимент представлен на фигуре 13. Среднее значение IC_{50} для 969.g0 в анализе с использованием моноцитов составляло 24,6 нг/мл, тогда как IC_{50} для 969.g5 составляло 333,0 нг/мл. Это указывало на 13,5-кратное снижение активности антитела при сравнении обоих антител в анализе данного формата.

Для того, чтобы определить, почему гуманизованное антитело обладает пониженной активностью в анализе на ингибирование MCP-1, было проведена серия экспериментов с использованием антитела

Ab969. Полученные данные позволяют предположить, что потеря активности Ab969.g5, наблюдаемая в анализе на ингибирование MCP-1, происходит из-за очередности добавления антитела и лиганда к клеткам-мишеням. При проведении анализа на конкурентное связывание, активность обоих Ab969.g0 и Ab969.g5 снижалась, но что еще более важно, что в данном случае, наибольшее различие наблюдалось в отношении активности блокирования. Для того, чтобы определить, может ли снижение величины "константы ассоциации" гуманизированного антитела Ab969 приводить к снижению активности, был проведен анализ Viascore. Эти данные показали, что K_D для Ab969.g0 и Ab969.g5 были аналогичными, а K_a для Ab969.g5 была ниже и составляла $1,57 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, а для 969.g0, она составляла $2,16 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (см. табл. 5). В анализе на конкурентное связывание, если CSF-1 и анти-CSF-1R антитело конкурировали за связывание с одним и тем же рецептором, то снижение константы ассоциации могло приводить к снижению блокирующей активности, в случае, когда константа ассоциации для лиганда также была высокой, и когда этот лиганд присутствовал в высокой концентрации. Известно, что человеческий CSF-1 имеет особенно высокую константу ассоциации, составляющую $2,19 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и аналогичную константе ассоциации для антител, а поэтому, данный анализ проводили с использованием высокой концентрации CSF-1 (250 нг/мл).

Для того, чтобы подтвердить, что снижение блокирующей активности 969.g5 зависит от природного свойства антитела, был проведен ELISA-анализ для оценки связывания CSF-1 с CSF-1R. Поэтому, данный метод был назван "методом ELISA-анализа на блокирование лиганда". Этот анализ проводили посредством конкурентного связывания, где CSF-1 и антитело предварительно смешивали, а затем наносили на планшет, связанный с CSF-1R. Этот анализ также проводили для оценки влияния концентрации CSF-1 на активность антитела.

При измерении IC_{50} 969.g0 и 969.g5 в анализе ELISA на блокирование лиганда с использованием CSF-1 в концентрации 1 нг/мл было обнаружено, что эти антитела обладали аналогичной активностью при IC_{50} 12,83 нг/мл и 19,65 нг/мл, соответственно. Если в этом анализе концентрация CSF-1 составляла 10 нг/мл, то IC_{50} обоих антител Ab969.g0 и Ab969.g5 возрастала, и что более важно, что различие между ними увеличивалось до 79,29 нг/мл и до 268,10 нг/мл, соответственно. Эта динамика также наблюдалась в анализе, проводимом с использованием 100 нг/мл CSF-1, где Ab969.g0 и Ab969.g5 имели величины IC_{50} , составляющие 828,70 нг/мл и 3947,00 нг/мл, соответственно. Анализ на конкурентное связывание показал, что Ab969.g5 является менее активным, чем Ab969.g0 в отношении блокирования связывания CSF-1 с CSF-1R. Такое снижение активности становится более заметным при увеличении концентрации CSF-1.

iv) Идентификация гуманизированных привитых антител Ab969 с активностью, эквивалентной активности химерного антитела Ab969 в анализе на ингибирование MCP-1

Панель промежуточных гуманизированных привитых антител Ab969 получали путем транзientной экспрессии так, чтобы можно было сравнить активности *in vitro* (табл. 8). Соответствующее химерное антитело (Ab969.g0) и полностью гуманизированное привитое антитело (Ab969.g5) были также включены в анализ на транзientную экспрессию для прямого сравнения свойств антител одной и той же партии.

Таблица 8

Антитело	Антитело	Донорные остатки VK	Донорные остатки VH
969.g0	969cHcL	N/A	N/A
969.g7	969gH2gL4	K38, Y71	-
969.g9	969gH2gL6	K38	-
969.g2	969gH2gL7	Y71	-
969.g5	969gH2gL8(SG)	-	-

In vitro активность каждого антитела тестировали в анализе на ингибирование MCP-1. В анализе этого формата осуществляли титрование CSF-1 с использованием одной выбранной концентрации антитела, поскольку такой формат позволяет осуществлять быстрый скрининг широкой панели антител и выявлять различия в их активности блокирования CSF-1R. В этом анализе было детектировано дозозависимое высвобождение MCP-1 из первичных человеческих моноцитов и была обнаружена относительная способность каждого антитела блокировать активность CSF-1R, измеренную по концентрации CSF-1 при высвобождении MCP-1. Моноциты высевали при плотности 20000 клеток на лунку в среду в присутствии титруемого рекомбинантного человеческого CSF-1 (при 2-кратном серийном разведении с получением 18 концентраций, максимум 500 нг/мл). Затем добавляли одну дозу 1 мкг/мл антитела. Клетки инкубировали в течение 24 ч, и супернатант собирали. Секретированный MCP-1 оценивали с помощью ELISA. Анализ на ингибирование MCP-1 показал, что антитела Ab969.g2 и Ab969.g7 сохраняли высокую активность блокирования CSF-1R, и при этом, обе молекулы были способны полностью ингибировать секрецию MCP-1 при добавлении CSF-1 к моноцитам в концентрации более 100 нг/мл (фиг. 14). В этом анализе была детектирована заметная потеря активности антитела Ab969.g5, и это антитело могло ингибировать секрецию MCP-1 только при увеличении концентрации CSF-1 до 10 нг/мл. Аналогичным образом, антитело Ab969.g9 обладало пониженной CSF-1R-блокирующей активностью по сравнению с антителами Ab969.g2 и Ab969.g7.

IC_{50} выбранных гуманизированных привитых антител Ab969 оценивали в анализе на MCP-1 для более

точного подтверждения относительной способности антитела ингибировать CSF-1-опосредуемую активацию моноцитов. В данном случае, очень важно, чтобы оценка активности антител была проведена с использованием нескольких различных доноров, но без объединения моноцитов, взятых из смешанных источников. В табл. 9 представлены величины IC_{50} для антител, собранные из анализов, проводимых для Ab969 с использованием 6 различных доноров.

Гуманизованные привитые антитела Ab969.g2 и Ab969.g7 имели относительную IC_{50} , сравнимую с IC_{50} химерного антитела Ab969.g0. Антитело Ab969.g5 резко отличается от вышеуказанных антител тем, что оно обладает гораздо меньшей активностью в данном анализе (среднее отношение IC_{50} для химерного антитела/привитого антитела составляет 19,6).

Таблица 9

Антитело	Донорные остатки VK	Донорные остатки VH	IC_{50} (нг/мл)							
			Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5	Донор 6	Среднее \pm ср. кв. ош.	Среднее для химерного/привитого антитела
969.g0	N/A	N/A	31.0	5.7	59.4	41.7	20.9	7.1	27.6 +/- 8.5	N/A
969.g7	K38, Y71	-	46.3 (1.5)	6.1 (1.1)	N/A	N/A	N/A	N/A	26.2 +/- 14.2	1.3
969.g2	Y71	-	N/A	N/A	80.6 (1.4)	42.2 (1.0)	22.3 (1.1)	14.4 (2.0)	39.9 +/- 14.8	1.3
969.g5	-(SG)	-	667.1 (21.5)	100.3 (17.6)	N/A	N/A	N/A	N/A	383.7 +/- 200.4	19.6

v) Аффинность панели гуманизованных антител Ab969. Аффинность каждого из гуманизованных привитых антител Ab969 и родительских химерных антител оценивали с помощью анализа VIAcore (табл. 10), где проводили три независимых эксперимента, в которых вычисляли средние величины. Полученные данные показали, что аффинность (K_D) явно не изменялась после гуманизации химерной молекулы (Ab969.g0) с получением "полностью гуманизованного антитела" Ab969.g5. Однако, "константа ассоциации" антитела снижалась в случае, если гуманизацию проводили после прививки Ab969.g2; при этом, антитела Ab969.g4 и Ab969.g5 имели более низкие величины K_a , чем величины, наблюдаемые до прививки. Кроме того, K_a для Ab969.g5 была ниже, чем для Ab969.g4, что может указывать на то, что замена сайта изомеризации DG на сайт изомеризации SG приводит к еще большему снижению "константы ассоциации" антитела.

Таблица 10

Привитое антитело	Название антитела	Донорные остатки VK	Донорные остатки VH	K_a ($M^{-1}c^{-1}$)	K_d (c^{-1})	K_D (nM)
969cHcL	969.0	N/A	N/A	2.83E+06	1.03E-05	3.6
				2.79E+06	1.10E-05	3.9
				2.68E+06	9.51E-06	3.6
				2.77E+06	1.03E-05	3.7
969gH1gL1	969.g1	K38, Y71, F87	A78	2.65E+06	8.47E-06	3.2
				2.57E+06	6.04E-06	2.4
				2.51E+06	9.88E-06	3.9
				2.58E+06	8.13E-06	3.2
969gH2gL1	969.g6	K38, Y71, F87	-	2.43E+06	8.84E-06	3.6
				2.44E+06	8.95E-06	3.7
				2.54E+06	6.63E-06	2.6
				2.47E+06	8.14E-06	3.3
969gH2gL4	969.g7	K38, Y71	-	2.57E+06	7.73E-06	3.0
				2.60E+06	9.41E-06	3.6
				2.52E+06	1.15E-05	4.6
				2.56E+06	9.55E-06	3.7
969gH2gL7	969.g2	Y71	-	2.46E+06	1.07E-05	4.3
				2.49E+06	8.39E-06	3.4
				2.44E+06	8.74E-06	3.6
				2.46E+06	9.28E-06	3.8
969gH2gL8	969.g4	-	-	1.99E+06	5.00E-06	2.5
				1.94E+06	6.65E-06	3.4
				1.97E+06	5.00E-06	2.5
				1.97E+06	5.55E-06	2.8
969gH2gL8(SG)	969.g5	-	-	1.71E+06	5.00E-06	2.9
				1.85E+06	7.03E-06	3.8
				1.84E+06	6.76E-06	3.7
				1.80E+06	6.26E-06	3.5

Выводы.

Тестирование панели гуманизованных привитых антител Ab969, проводимое в нескольких анализах, показало, что тирозиновый остаток в положении 71 (например, Y71) в легкой цепи повышает активность антитела. Замена Y71, например, фенилаланином приводит к снижению константы ассоциации (снижению K_a) по сравнению с константой ассоциации родительской химерной молекулы. Это, в свою очередь, приводит к снижению способности антитела блокировать связывание CSF-1 с CSF-1R, наблюдаемому в анализе, проводимом путем мониторинга активности CSF-1R в первичных человеческих моноцитах (в анализе на ингибирование MCP-1).

Пример 4. Молекулярная стабильность панели гуманизованных антител Ab969.

1) Термостабильность.

Термостабильность (измеряемая по температуре плавления, T_m) была определена двумя независи-

мыми методами, один из которых представляет собой мониторинг разворачивания белка при связывании флуоресцентного красителя с доступными гидрофобными поверхностями (метод ThermoFluor), а другой представляет собой калориметрический (ДСК) и ортогональный метод.

T_m , измеренные методом ThermoFluor для различных привитых антител 969 (в PBS, pH 7,4), систематизированы в табл. 11.

Таблица 11

Образец	Средняя T_m1 (°C)	T_m1 ср. кв. ош, (°C)	Средняя T_m2 (°C)	T_m2 ср. кв. ош, (°C)
969.g2	80,5	0,6	65,6	0,4
969.g2	80,5	0,6	65,6	0,4
969.g5	79,7	0,6	64,7	0,2
969.g5 (pH 5.0)	82,7	0,1	59,9	0,5
969.g7	79,8	0,5	65,9	0,4
969.g9	79,4	0,5	65,8	0,5
IgG4, контроль	66,4	0,8	ND	ND

Вообще говоря, T_m Fab', измеренные методом ThermoFluor, позволяют предположить, что большинство привитых антител 969 имеют более высокую термостабильность, чем контрольный IgG4.

ii) Влияние концентрации образца на его предрасположенность к агрегации.

Было исследовано влияние концентрации антитела на его стабильность в PBS, pH 7,4, поскольку концентрация является показателем стабильности образцов во время их хранения.

Эксперимент 1.

Антитела концентрировали до >10 мг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 дней. Сразу после концентрирования (T_0) 969.g7 появлялась мутность, а после концентрирования 969.g8 наблюдалось легкое помутнение. В отличие от этого, образец 969.g5, как показал анализ, был прозрачным при визуальном осмотре. После инкубирования в течение 5 дней при комнатной температуре, образец 969.g5 оставался прозрачным, тогда как образцы 969.g7 и 969.g8 продолжали агрегироваться, и каждый из них образовывал густой осадок.

Исходя из результатов этого исследования, образцы можно расположить в следующем порядке по их резистентности к агрегации в данных условиях: 969.g5 > 969.g8 > 969.g7.

Эксперимент 2.

Перед концентрированием, все три образца антитела были прозрачными при визуальном осмотре, за исключением антитела 969.g6 (при 4,68 мг/мл), которое оставалось непрозрачным. После концентрирования до 16 мг/мл, осаждение 969.g6 наблюдалось после хранения в течение 24 ч при комнатной температуре и при 4°C. Однако оба антитела 969.g1 и 969.g4 оставались прозрачными при визуальном осмотре. После дополнительного инкубирования в течение 5 дней наблюдалось образование крупных частиц образца 969.g1 при комнатной температуре и при 4°C. Какой-либо агрегации образца 969.g4 не наблюдалось ни при комнатной температуре, ни при 4°C, как было оценено путем визуального осмотра.

Это исследование показало, что образец 969.g6 обнаруживал некоторую нестабильность в отношении агрегации во время его хранения при низкой концентрации (4,68 мг/мл) в PBS, pH 7,4. Кроме того, при более высокой концентрации антитела, его осаждение усиливалось. Концентрированное 969.g1 обнаруживало более медленную скорость агрегации, тогда как концентрированное 969.g4 оставалось стабильным до 5 дней при любой температуре хранения. Поэтому, указанные образцы можно расположить в следующем порядке по их стабильности к агрегации: 969.g4 > 969.g1 > 969.g6.

Эксперимент 3. Антитела 969.g2, 969.g5, 969.g7 и 969.g9.

Был проведен анализ образцов сразу после их концентрирования (T_0), после их инкубирования в течение ночи и после их концентрирования в течение 5 дней. Все образцы, до их концентрирования, были прозрачными при визуальном осмотре и в них не наблюдалось какого-либо образования частиц. Сразу после концентрирования до 23,07 мг/мл, образец 969.g7 осаждался так, как это наблюдалось ранее в эксперименте 1. Образец 969.g9 был слегка мутноватым, и такая мутность становилась более заметной после хранения в течение 24 часов при комнатной температуре или при 4°C. Все другие привитые антитела 969 были прозрачными при визуальном осмотре сразу после концентрирования.

После инкубирования в течение 21 дня и после инкубирования в течение ночи при комнатной температуре, какого-либо видимого изменения этих образцов не наблюдалось; причем, привитые антитела 969.g7 и 969.g9 агрегировались после концентрирования этих образцов, а другие образцы не обнаруживали какой-либо явной агрегации при визуальном осмотре.

В общих чертах, образец 969.g2 обнаруживал по меньшей мере тенденцию к агрегации по мере увеличения его концентрации. Это также коррелировало с максимальной T_m , как было определено методом Thermofluor.

Выводы.

В процессе экспрессии и очистки панели гуманизованных антител Ab969 было обнаружено, что увеличение концентрации антитела до более, чем 10 мг/мл приводило к быстрому осаждению некоторых гуманизованных привитых антител. В частности, антитела Ab969.g1, Ab969.g6 и Ab969.g7 образовывали осадок, тогда как антитела Ab969.g2, Ab969.g4 и Ab969.g5 не образовывали осадка. Полученные данные показали, что замена лизинового остатка в положении 38 (K38) в легкой цепи на глутамин приводила к повышению стабильности антитела после его концентрирования до значения, превышающего 10 мг/мл.

Пример 5. In vitro анализ Ab969.g2.

i) Последовательность Ab969.g2

Ab969.g2 содержит привитую легкую цепь gL7 и привитую тяжелую цепь gH2. Выравнивание последовательностей V-области крысиного (донорного) антитела с последовательностями V-области человеческого (акцепторного) антитела зародышевой линии проиллюстрировано на фиг. 2A и 2B, и на этих фигурах также проиллюстрированы конечные гуманизованные последовательности привитой легкой цепи gL7 и привитой тяжелой цепи gH2.

Все каркасные остатки привитой тяжелой цепи gH2 происходят от гена человеческой зародышевой линии. Глутаминовый остаток в положении 1 каркасной области человеческой тяжелой цепи был заменен глутаминовой кислотой (E1) для повышения уровня экспрессии и очистки гомогенного продукта, например, путем превращения глутамата в пироглутамат у N-конца антител и их фрагментов.

Все каркасные остатки привитой легкой цепи gL7 происходят от гена человеческой зародышевой линии, за исключением остатка 71 (по нумерации Кэбата), где этот донорный тирозиновый остаток был сохранен. Сохранение этого остатка способствовало повышению активности гуманизованного антитела как описано в примере 3.

ii) Ингибирование IL-34-зависимой активации человеческих моноцитов.

Активность Ab969.g2 сравнивали с активностью 969.g0 с помощью анализа на IL-34-зависимую активацию человеческих моноцитов. Этот эксперимент проводили с использованием двух отдельных доноров моноцитов и вычисляли среднюю IC_{50} для ингибирования IL-34-опосредуемой стимуляции моноцитов (табл. 12). Какого-либо значимого различия в IC_{50} между антителами Ab969.g2 и Ab969.g0 не наблюдалось.

Первичные человеческие моноциты высевали при плотности 20000 клеток на лунку в среду в присутствии 100 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-34 и титруемой дозы анти-CSF-1R антитела (при полулогарифмическом серийном разведении с получением 16 концентраций, максимум 10 мкг/мл). Клетки инкубировали в течение 24 ч, и супернатант собирали. Секретированный MCP-1 оценивали с помощью ELISA (R&D systems DY279). На графике представлен процент ингибирования продуцирования MCP-1 по отношению к CSF-1, используемому только в качестве контроля.

Таблица 12

Антитело	IC_{50} (нг/мл)		
	Донор 1	Донор 2	Среднее \pm ср.кв.ош.
969.g0	20.10	9.79	14.95 \pm 5.17
969.g2	20.58	9.59	15.09 \pm 5.51

iii) Связывание Ab969.g2 с SNP человеческого CSF-1R.

В лиганд-связывающем домене человеческого гена CSF-1R наблюдался полиморфизм в четырех несинонимичных отдельных нуклеотидах (SNP), который был зарегистрирован у человека. Эти SNP представляют собой V32G, A245S, H247P и V279M (фиг. 1F). Каждый вариант SNP человеческого CSF-1R был генерирован и стабильно экспрессировался в клеточных линиях. Связывание Ab969.g2 с каждым SNP было подтверждено с помощью проточной цитометрии.

Пример 6. Анализ, проводимый с использованием фармакодинамического маркера у собакоподобных обезьян.

Фармакокинетическое/фармакодинамическое (ФК/ФД) исследование гуманизованного моноклонального анти-CSF-1R антитела 969.g2 осуществляли для того, чтобы продемонстрировать фармакологическую активность антитела у приматов, не являющихся человеком (у собакоподобных обезьян). Группам из трех собакоподобных обезьян внутривенно вводили одну дозу 7 мг/кг (Группа 1) или 1,5 мг/кг (Группа 2) антитела 969.g2. Это антитело хорошо переносилось животными и не давало каких-либо побочных клинических эффектов. Пробы сыворотки брали в различные периоды времени в течение всего 25-дневного исследования.

Концентрацию 969.g2 в сыворотке измеряли с помощью ELISA и проводили фармакокинетический анализ (табл. 13). ФК-параметры вычисляли с использованием компьютерной программы WinNonlin.

$t_{1/2}$ означает время полужизни антитела в сыворотке.

C_{max} означает максимальную концентрацию антитела в сыворотке.

AUC означает площадь под кривой (вычисляемую как интеграл функции "концентрация - время") и является показателем общего воздействия лекарственного средства.

Клиренс означает объем плазмы, очищенной от лекарственного средства за единицу времени.

Объем распределения представляет собой условный объем, в котором распределяется лекарственное средство.

При этом существует хорошая корреляция между наблюдаемыми и предсказанными величинами (животное 2 было исключено как нетипичный случай). C_{\max} пропорциональна дозе; AUC пропорционально, но в более высокой степени, превышает дозу, что указывает на более медленный клиренс при более высокой дозе. Большинство антител 969.g2 детектировалось в сыворотке.

Таблица 13

Животное	Доза [мг/кг]	$t_{1/2}$ [ч]	C_{\max} [мкг/мл]	AUC _{TNF_obs} [ч·мкг/мл]	Клиренс (Cl_{obs}) [мл/ч/кг]	Объем распределения ($V_{z_{obs}}$) [мл/кг]
1	7	66,1	209,4	23184,5	0,30	28,8
2	7	30,3	117,6	6075,9	1,15	50,4
3	7	63,3	188,7	16761,0	0,42	38,1
4	1,5	27,9	36,1	1928,1	0,78	31,3
5	1,5	22,7	34,7	1668,6	0,90	29,5
6	1,5	27,1	36,6	1634,8	0,92	35,9

Главный путь клиренса CSF-1 осуществляется посредством связывания CSF-1 с его когнатным рецептором CSF-1R. Как и предполагалось, блокирование связывания CSF-1 с CSF-1R приводит к увеличению концентрации CSF-1 в сыворотке посредством предупреждения опосредуемого рецептором клиренса, то есть, феномена, наблюдаемого у мышей-моделей. Следовательно, увеличение концентрации CSF-1 в сыворотке является фармакодинамическим маркером связывания и ингибирования CSF-1R.

Введение обеих доз 969.g2 приводило к быстрой и значительной аккумуляции CSF-1 в сыворотке. Этот эффект является дозозависимым, причем, доза 7 мг/кг давала максимальную концентрацию CSF-1, которая приблизительно в 10 раз превышала концентрацию, наблюдаемую при введении дозы 1,5 мг/кг. При нормализации уровней CSF-1 после клиренса антитела наблюдалось соответствующее отношение фармакокинетических/фармакодинамических параметров. По окончании исследования, уровни CSF-1 возвращались к своим базовым значениям у обеих групп обработки. Результаты представлены на фигурах 15a и 15b.

На фиг. 15a указана концентрация CSF-1 в образцах сыворотки, взятых у собакоподобных обезьян, которым была внутривенно введена разовая доза 7 мг/кг Ab969.g2. Концентрацию CSF-1 в сыворотке определяли в двух независимых анализах. На этом графике представлена средняя концентрация CSF-1 для трех животных в Группе 1 (7 мг/кг) со стандартным отклонением (квадраты). На этом графике также представлена средняя концентрация Ab969.g2 в сыворотке (кружки).

На фиг. 15a указана концентрация CSF-1 в образцах сыворотки, взятых у собакоподобных обезьян, которым была внутривенно введена разовая доза 1,5 мг/кг Ab969.g2. Концентрацию CSF-1 в сыворотке определяли в двух независимых анализах. На этом графике представлены средняя концентрация CSF-1 для трех животных в Группе 2 (1,5 мг/кг) со стандартным отклонением (квадраты). На этом графике также представлена средняя концентрация Ab969.g2 в сыворотке (кружки).

Существует две основных популяции моноцитов, циркулирующих в кровотоке человека и собакоподобных обезьян: (i) "классические" CD14⁺CD16⁻-моноциты и (ii) "неклассические" или "резидентные" CD14⁺CD16⁺-моноциты. На мышиных моделях было продемонстрировано, что резидентные тканевые макрофаги, включая TAM, происходят от не-классической популяции моноцитов. Кроме того, не-классические моноциты образуются в результате последующей дифференцировки классической популяции моноцитов.

Был проведен мониторинг популяции моноцитов в кровотоке собакоподобных обезьян, которым вводили дозу 969.g2, с помощью четырехцветной проточной цитометрии цельной крови. Проточная цитометрия была проведена с использованием PerCP-конъюгированных антител против CD45 собакоподобных обезьян, APC-конъюгированных антител против человеческого HLA-DR, FITC-конъюгированных антител против человеческого CD14 (клона Mu4) и PE- конъюгированных антител против человеческого CD16 (клона 3G8). Для каждого антитела регистрировали соответствующие окна возбуждения флуоресценции с использованием соответствующего антитела, которое служило в качестве антитела контрольного изотипа. Классические моноциты были определены как CD45⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD16⁻. Неклассические моноциты были определены как CD45⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD16⁺.

Введение обеих доз 969.g2 приводило к постепенному истощению не-классических CD14⁺CD16⁺-моноцитов в течение первой недели проведения исследования. Почти полное истощение неклассических

моноцитов наблюдалось при введении дозы 7 мг/кг. Снижение уровня не-классических моноцитов после введения доз 7 мг/кг и 1,5 мг/кг достигало своего максимума на 4-й день и возвращалось на исходные уровни на день 11. Результаты представлены на фигуре 15с. На гистограммах представлено среднее число циркулирующих не-классических CD14⁺CD16⁺-моноцитов в определенные периоды времени в течение всего исследования (дни (D) 0, 1, 4, 18 и 25) со стандартным отклонением. На графике также представлена кривая зависимости средней концентрации CSF-1 в сыворотке со стандартным отклонением.

В этом примере было подтверждено, что (i) антитело 969.g2 способно связываться с CSF-1R и блокировать его связывание с CSF-1 у собакоподобных обезьян, (ii) антитело 969.g2 обладает фармакологической активностью у приматов-моделей, не являющихся человеком, (iii) антитело 969.g2 селективно истощает неклассическую популяцию моноцитов собакоподобных обезьян *in vivo*, где указанная популяция моноцитов, очевидно, является предшественниками опухолеассоциированных макрофагов, и (iv) концентрация CSF-1 в сыворотке может служить в качестве биомаркера для оценки активности 969.g2.

Пример 7. Ингибирование роста ксенотрансплантатов MCF-7 рака молочной железы.

Антитело 969.g2 не способно связываться с мышшиным CSF-1R. В соответствии с этим, исследования на мышшах *in vivo* осуществляли с использованием антитела Ab535 против мышшиного CSF-1R для оценки возможности применения антитела Ab969.g2 для лечения рака и фиброза. Было показано, что Ab535 обладает свойствами и активностью, сравнимыми со свойствами и активностью Ab969.g2 в ряде экспериментов *in vitro*.

Было показано, что Ab535 ингибирует CSF-1-опосредуемое выживание моноцитов, как описано в примере 2, (iii), имеет сравнимую аффинность как описано в примере 2 (iv) и не стимулирует интернализацию CSF-1R, как описано в примере 2 (vii).

In vivo исследование Ab535 на модели ксенотрансплантата MCF-7 рака молочной железы *in vivo* осуществляли следующим образом.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность антитела Ab535, вводимого подкожно (s.c), по сравнению с терапевтической эффективностью контрольного антитела, положительного контроля и контроля-носителя у иммунодефицитных "голых" мышшей с подкожными ксенотрансплантатами MCF-7 рака молочной железы человека. Ингибирование роста опухоли использовали в качестве терапевтического параметра. MCF-7 человеческого рака молочной железы использовали в качестве модели подкожного ксенотрансплантата у самок иммунодефицитных мышшей NMRI:nu/nu. Клеточная линия MCF-7 была получена из банка опухолей Национального института рака (США). Для проведения экспериментальных исследований, клетки культивировали *in vitro* в среде RPMI 1640 medium + 10% FCS. Клетки собирали из суб-конфлюентных культур и подкожно вводили мышсам. Обработку начинали после того, как опухоль достигала пальпируемого размера (4-10 мм). Тестируемые соединения и контроль-носитель вводили s.c. три раза в неделю. Положительный контроль вводили внутривенно один раз в день на дни 24, 33 и 40. Объем инъекций был индивидуально скорректирован по массе тела на время инъекции. Диаметры опухоли измеряли три раза в неделю штангенциркулем. Объемы опухолей вычисляли по формуле $V = (\text{длина} \times (\text{ширина})^2) / 2$. Для вычисления относительного объема опухоли (RTV), объемы в каждый день измерения нормализовали на день первой обработки. Для каждого дня измерения вычисляли медианные и средние значения объемов опухолей на группу, а также медианные значения обработка/контроль (T/C) в процентах.

Результаты представлены на фиг. 16. Ab535 давало дозозависимый противоопухолевый эффект. Обе дозы контрольного мышшиного антитела IgG не индуцировали ингибирование роста опухоли. Относительные объемы опухоли были сравнимы с объемами, наблюдаемыми при обработке носителем-контролем и положительным контролем, ингибирующим рост опухоли.

Выводы. Тестируемое антитело Ab535 индуцировало статистически значимый противоопухолевый эффект у животных с ксенотрансплантатом MCF-7 человеческого рака молочной железы при самой высокой дозе (30 мг/кг/день).

Пример 8. Ингибирование роста ортотопической клеточной линии PC-3 рака предстательной железы

Противоопухолевая и антиметастатическая эффективность антитела Ab535 была также протестирована с использованием модели ортотопической клеточной линии PC-3 рака предстательной железы *in vivo*. Клеточная линия PC-3 была генетически модифицирована для непрерывной экспрессии люциферазы, что позволяло проводить биолюминесцентный визуализирующий анализ *in vivo*, а также мониторинг роста опухоли *in vivo* и анализ на метастазы *ex vivo* в выбранных органах.

Это исследование проводили на 6 экспериментальных группах, каждая из которых включала либо 11 (Группа 5), либо 12 (все остальные группы) самцов "голых" мышшей NMRI после рандомизации. На день 0, клетки PC-3 ортотопически имплантировали в предстательную железу всех самцов "голых" мышшей NMRI, включенных в исследование. На день 3, начало роста опухоли подтверждали посредством биолюминесцентной визуализации *in vivo*. На день 8 проводили вторую биолюминесцентную визуализацию *in vivo*, и животных с опухолями произвольно распределяли по шести группам в соответствии с результатами визуализации так, чтобы средняя интенсивность биолюминесценции и размер опухоли были аналогичными для каждой группы. На следующий день (день 9) начинали терапию. Животным Групп 2 и

3 подкожно вводили 30 и 10 мг/кг контрольного антитела, соответственно, 3 раза в неделю до дня 42. Животным Групп 4 и 5 подкожно вводили 30 и 10 мг/кг антитела Ab535, соответственно, 3 раза в неделю до дня 42. Животным Группы 1 подкожно вводили носитель-контроль, и такой носитель (PBS) вводили 3 раза в неделю до дня 42. Животным Группы 6 вводили положительный контроль, и 360 мг/кг такого контроля вводили внутривенно один раз в неделю в течение четырех недель (на дни 10, 17, 24 и 31). Во время проведения исследования проводили мониторинг роста ортотопических клеток имплантированных опухолей PC-3 *in vivo* на дни 3, 8 (рандомизация), 15, 22, 29, 36 и 43 путем биоломинесцентной визуализации.

По окончании исследования проводили некропсию. После этого определяли массу и объем первичной опухоли. Затем извлекали отобранные органы (печень, селезенку и легкие), и часть каждого органа фиксировали в формалине, а остальную часть анализировали на метастазы путем биоломинесцентной визуализации с помощью анализа на люциферазу *in vitro*. Кроме того, извлекали бедренную кость из одной лапы и часть поясничного отдела позвоночника для оценки характера метастазирования с помощью анализа *in vitro* на люциферазу.

Биоломинесцентный сигнал *in vivo* состоял из первичной опухоли и метастазов (визуализация всего организма). Исходя из данных, полученных для всех групп строили кривую роста опухоли (фиг. 17). До рандомизации и начала терапии, развитие опухоли было одинаковым для всех исследуемых групп вплоть. Затем, у Группы 1, которой вводили носитель-контроль, а также у Групп 2 и 3, которым вводили контрольное антитело RTE11, наблюдался обычный рост опухоли. У группы, которой вводили положительный контроль, наблюдалось значительное снижение роста опухоли, как было определено *in vivo* на день 43 (Группа 6). Мониторинг, проводимый путем биоломинесцентной визуализации *in vivo*, показал, что введение антитела Ab535 в количестве 30 или 10 мг/кг, соответственно (Группы 4 и 5), приводило к значительному снижению роста опухоли.

Объем и исходную массу первичной опухоли определяли путем некропсии на день 14. В группе положительного контроля (Группа 6) наблюдалось значительное снижение объема и массы первичной опухоли. Введение антитела Ab535 в количестве 30 мг/кг (Группа 4) приводило к значительному снижению объема и массы первичной опухоли. При введении антитела Ab535 в количестве 10 мг/кг (Группа 5), снижение объема опухоли было хоть и заметным, но не таким, как это наблюдалось у Группы 4. У Группы, которой вводили контрольное антитело, какой-либо явной противоопухолевой активности не наблюдалось.

После некропсии оценивали люциферазную активность первичной опухоли методом биоломинесцентной визуализации. Полученные результаты были сравнимы с результатами, полученными после некропсии, и по этим результатам была построена кривая роста опухоли *in vivo*. Введение положительного контроля (Группа 6) приводило к значительному снижению люциферазной активности первичной опухоли. Введение антитела Ab535 в количестве 30 мг/кг (Группа 4) приводило к значительному снижению люциферазной активности первичной опухоли, но такое снижение было менее заметным, чем при введении антитела Ab535 в количестве 10 мг/кг (Группа 5). У Группы, которой вводили контрольное антитело, какого-либо значительного снижения люциферазной активности не наблюдалось.

Несколько дополнительных органов (печень, селезенку, легкие, бедро и часть поясничного отдела позвоночника) анализировали методом биоломинесцентной визуализации *ex vivo*. В случае положительного контроля, значительное снижение люциферазной активности наблюдалось в бедре и в поясничном отделе позвоночника, тогда как в печени и в селезенке, такое снижение сигнала было несколько ниже. При введении антитела Ab535 в количестве 30 мг/кг (Группа 4), снижение люциферазной активности было значительным в печени и не очень значительным во всех других органах. Контрольное антитело (Группы 2 и 3) не давало какого-либо снижения люциферазной активности во всех тестируемых органах.

В заключение можно отметить, что на этой модели опухоли была продемонстрирована значительная противоопухолевая и заметная антиметастатическая эффективность антитела Ab535.

Пример 9. Эффект анти-CSF-1R антитела у животных с моделью фиброза легких, индуцированного блеомицином *in vivo*.

Блеомицин представляет собой антибиотик, впервые выделенный из бактерии *Streptomyces verticillatus* и используемый в качестве химиотерапевтического средства для лечения рака различных типов. Индуцированная блеомицином модель фиброза легких представляет собой хорошо известную модель, которая подробно описана в публикации Madtes, DK et al, 1999, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20, 924-34. Полный протокол можно найти в следующих работах: Morschl, E., Molina, J. G., Volmer, J., Mohsenin, A., Pero, R. S., Hong, J. S., Kheradmand, F., Lee, J. J. and Blackburn, M. R. (2008), A3 adenosine receptor signaling influences pulmonary inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39: 697-705.

Все мыши, а именно, самки мышей дикого типа C57Blk6 (20 г) были закуплены в лаборатории Harlan Labs. Этим мышам делали инстилляцию посредством интратрахеального разреза (IT), при которой мышам анестезировали авертином, после чего проводили трахеостомию для инстилляций 3,5 унифицированных доз блеомицина в 50 мкл физиологического раствора или для инстилляций 50 мкл только физиологического раствора, используемого в качестве контроля. Такая обработка приводила к развитию воспалительного процесса, который достигал своего пика на 7-ой день после введения блеомицина, и к

развитию фиброза, который достигал своего максимума на 21-й день после введения блеомицина. Был проанализирован эффект антитела Ab535, которое вводили только животному с моделью фиброза, где указанное антитело было введено подкожно в дозе 30 мг/кг три раза в неделю на дни 9-21. Затем, на 21-й день, животных умерщвляли и получали данные анализа, который включал гистопатологический анализ легких, анализ клеток в физиологической жидкости BAL (в бронхоальвеолярном лаваже) и измерение уровня растворимого коллагена в физиологической жидкости BAL. Гистопатологический анализ проводили для оценки поражения легких по модифицированной шкале оценок Эшкрофта для определения тяжести фиброза легких (Hubner RH et al, 2008, *Biotechniques* 44: SOT-17). Извлеченные легкие заливали 10% формалином до отметки 25 см и обрабатывали серией спиртов и ксиленов, после чего заливали в парафин, и срезы тканей депарафинизировали, а затем обрабатывали и окрашивали трехцветным реагентом Мэссона.

Количество растворимого коллагена в физиологической жидкости BAL оценивали с помощью коммерчески доступного аналитического набора Sircol в соответствии с инструкциями производителей.

Воздействие на популяцию макрофагов в физиологической жидкости BAL оценивали с использованием препаратов, приготовленных на цитоцентрифуге. Аликвоты клеток в BAL центрифугировали, помещали на предметные стекла микроскопа, окрашивали реагентом Диффа-Квика и подсчитывали число макрофагов.

Было обнаружено, что терапевтическое лечение анти-CSF-1R антителом Ab535, которое вводили начиная с 9-го дня, приводило к значительному ослаблению симптомов фиброза легких, индуцированного блеомицином. При этом наблюдалось значительное снижение тяжести и степени фиброза. У обработанных мышей наблюдались снижение уровня продуцирования коллагена, положительная динамика фиброзного заболевания и повышение защиты легочной мембраны.

На фиг. 18a показано, что лечение индуцированного блеомицином фиброза легких антителом Ab535 приводило к снижению концентрации коллагена BALF по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 18b показано, что лечение индуцированного блеомицином фиброза легких антителом Ab535 приводило к снижению оценок по шкале Эшкрофта для образцов по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа, где такое сравнение показало, что у мышей, обработанных антителом Ab535, наблюдалось ослабление симптомов фиброза.

На фиг. 18 показано, что лечение индуцированного блеомицином фиброза легких антителом Ab535 приводило к снижению концентрации альбумина в сыворотке по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа, где такое сравнение показало, что у мышей, обработанных антителом Ab535, наблюдалось улучшение сосудистой проницаемости.

На фиг. 19 представлены репрезентативные изображения, полученные при гистопатологическом анализе легких животных, обработанных контрольным физиологическим раствором, блеомицином в комбинации с антителом контрольного изотипа и блеомицином в комбинации с антителом Ab535. У животных, обработанных антителом Ab535, наблюдалось значительное снижение тяжести фиброза легких по сравнению с животными, которым было введено антитело контрольного изотипа, и с животными, которым был введен блеомицин.

Пример 10. Эффект анти-CSF-1R антитела у дефицитных по аденозин-дезаминазе мышей с моделью фиброза легких.

Аденозин представляет собой нуклеозид, являющийся сильным сигнальным медиатором, уровни которого повышаются при клеточном стрессе или при поражении клеток, при этом, аденозин продуцирует ответы широкого ряда при его специфическом связывании с рецепторами, связанными с G-белком. Аденозин-дезаминаза (ADA) представляет собой фермент катаболизма пурина, который превращает аденозин в инозин. Были получены ADA-дефицитные мыши, у которых, как было обнаружено, наблюдались повышенные уровни аденозина в сыворотке, а также в тканях, таких как ткани почек, печени и легких (Blackburn, MR et al, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273(9): 5093-5100). Эти мыши имели признаки хронического заболевания легких, такие как альвеолярная деструкция, воспаление дыхательных путей и избыточное продуцирование слизи, которые ассоциируются с повышением уровней аденозина в легких (Blackburn MR et al, 2000, *J. Exp. Med.*, 192: 159-70). Эти эффекты, вследствие респираторного дистресса, приводят к гибели мышей в возрасте трех недель. Введение экзогенной ADA в низких дозах приводит к снижению уровней аденозина и к увеличению продолжительности жизни у мышей с моделью фиброза легких (Chunn JL et al, 2005, *J. Immunol.* 175: 1937-46, Pedrosa M et al, 2011, *PLoS One*, 6(7): e22667). У животных этой модели, постоянное увеличение уровней аденозина ассоциируется с увеличением уровней профибротических медиаторов, включая TGF β -1 в легких, с увеличением степени отложения коллагена в ткани легких и с повышением тяжести фиброза легких. Для исследования эффекта молекул с антифибротическим потенциалом, ADA-дефицитным мышам продолжали вводить низкую дозу экзогенного ADA в течение нескольких недель, а затем такую ADA-обработку прекращали и вводили агент, обладающий потенциальной антифибротической активностью.

Эффект анти-CSF-1R антитела Ab535 исследовали на ADA-дефицитных мышях с моделью фиброза легких. Мышам такой модели, дефицитным по этому ферменту, продолжали проводить терапию фер-

ментом ADA со дня 1 до дня 21 после рождения. Был получен конъюгат "ADA-полиэтиленгликоль (ПЭГ)" (Young HW et al, 2004, J. Immunol. 173: 1380-89), и этот конъюгат внутримышечно вводили на дни 1, 5, 9, 13 и 17 после рождения (0,625, 1,25, 2,5, 2,5 и 2,5 единиц соответственно), а затем этим животным внутрибрюшинно инъецировали 5 единиц этого конъюгата на день 21. После 21-го дня, фермент не вводили. Антитело Ab535 вводили подкожно в дозе 30 мг/кг, в объеме 100 мкл три раза в неделю со дня 25 (после рождения), и на 42-й день, животных умерщвляли.

На 42-й день, животных умерщвляли, и получали данные анализа, который включал гистопатологический анализ легких, анализ клеток в физиологической жидкости BAL и количественную оценку растворимого коллагена в физиологической жидкости BAL. Гистопатологический анализ проводили для оценки поражения легких по модифицированной шкале оценок Эшкрофта для определения тяжести фиброза легких (Hubner et al, 2008, Biotechniques 44: 507-17). Извлеченные легкие заливали 10% формалином до отметки 25 см и обрабатывали серией спиртов и ксиленов, после чего заливали в парафин, и срезы тканей депарафинизировали, а затем обрабатывали и окрашивали трехцветным реагентом Мэссона.

Количество растворимого коллагена в физиологической жидкости BAL оценивали с помощью коммерчески доступного аналитического набора Sircol в соответствии с инструкциями производителей.

Воздействие на популяцию макрофагов в физиологической жидкости BAL оценивали с использованием препаратов, приготовленных на цитоцентрифуге. Аликвоты клеток в BAL центрифугировали, помещали на предметные стекла микроскопа, окрашивали реагентом Диффа-Квика и подсчитывали число макрофагов.

Было обнаружено, что терапевтическое лечение анти-CSF-1R антителом Ab535 приводило к значительному ослаблению симптомов фиброза легких у ADA-дефицитных мышей. У обработанных мышей наблюдались снижение уровня продуцирования коллагена, положительная динамика фиброзного заболевания и повышение функции и защиты легочной мембраны.

На фиг. 20a показано, что лечение ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 приводило к снижению концентрации коллагена BALF по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа.

На фиг. 20b показано, что лечение ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 приводило к снижению оценок по шкале Эшкрофта для образцов по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа, где такое сравнение показало, что у мышей, обработанных антителом Ab535, наблюдалось ослабление симптомов фиброза.

На фиг. 20c показано, что лечение ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 приводило к снижению концентрации альбумина в сыворотке по сравнению с лечением антителом контрольного изотипа, где такое сравнение показало, что у мышей, обработанных антителом Ab535, наблюдалось улучшение сосудистой проницаемости.

На фиг. 20d показано, что лечение ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких антителом Ab535 приводило к снижению числа макрофагов в физиологической жидкости BAL.

На фиг. 21 представлены репрезентативные изображения, полученные при гистопатологическом анализе легких нормальных мышей (ADA+) и ADA-дефицитных мышей с индуцированным фиброзом легких (ADA⁻), обработанных антителом контрольного изотипа или антителом Ab535. У ADA-дефицитных мышей, обработанных антителом Ab535, наблюдалось значительное снижение тяжести фиброза легких по сравнению с мышами, которым было введено антитело контрольного изотипа.

В соответствии с этим, было показано, что у двух мышей с моделью фиброза легких, обработка анти-CSF-1R антителом может обеспечивать эффективное лечение фиброзного заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-CSF-1R антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO:4 для CDR-H1, последовательность SEQ ID NO:5 для CDR-H2 и последовательность SEQ ID NO:6 для CDR-H3, и легкую цепь, где переменный домен легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO:1 для CDR-L1, последовательность SEQ ID NO:2 для CDR-L2 и последовательность SEQ ID NO:3 для CDR-L3.

2. Анти-CSF-1R антитело или его фрагмент по п.1, где тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO:23.

3. Анти-CSF-1R антитело или его фрагмент по п.1 или 2, где легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO:15.

4. Анти-CSF-1R антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-3, где молекула антитела выбрана из группы, состоящей из полноразмерной молекулы антитела с полноразмерными тяжелыми и легкими цепями, или его фрагмента, выбранного из группы, состоящей из фрагмента Fab, модифицированного фрагмента Fab', фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv и фрагмента scFv.

5. Анти-CSF-1R антитело с переменным доменом тяжелой цепи, содержащим последовательность SEQ ID NO:23, и переменным доменом легкой цепи, содержащим последовательность SEQ ID NO:15.

6. Анти-CSF-1R антитело, где переменный домен легкой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична или аналогична последовательности переменного домена легкой цепи антитела по п.5, и где переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична или аналогична последовательности переменного домена тяжелой цепи антитела по п.1.

7. Анти-CSF-1R антитело с тяжелой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO:27, и легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO:19.

8. Анти-CSF-1R антитело, в котором тяжелая и легкая цепи по меньшей мере на 80% идентичны или аналогичны соответствующим тяжелым и легким цепям антитела по п.7.

9. Анти-CSF-1R антитело по любому из пп.1-8, аффинность связывания которого с CSF-1R равна 10 пМ или менее, чем 10 пМ.

10. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая антитело по любому из пп. 1-9.

11. Клонированный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей ДНК по п.10.

12. Вектор экспрессии, содержащий одну или несколько последовательностей ДНК по п.10.

13. Вектор по любому из пп.11 или 12, который содержит последовательности SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:20.

14. Вектор по любому из пп.11 или 12, который содержит последовательности SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:20.

15. Клетка-хозяин для получения антитела по любому из пп.1-9, содержащая вектор экспрессии по п.12.

16. Способ получения антитела по любому из пп.1-9, включающий культивирование клетки-хозяина по п.15 и выделение указанного антитела.

17. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественного новообразования или фиброзного заболевания, содержащая антитело по любому из пп.1-9 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемым наполнителем, разбавителем или носителем.

18. Применение антитела по любому из пп.1-9 в качестве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования или фиброзного заболевания.

19. Применение фармацевтической композиции по п.17 в качестве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования или фиброзного заболевания.

20. Применение антитела по любому из пп.1-9 для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики злокачественного новообразования, или для лечения или профилактики фиброзного заболевания.

21. Применение композиции по п.17 для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики злокачественного новообразования или для лечения или профилактики фиброзного заболевания.

22. Применение по пп.18-21, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака кости, колоректального рака, лейкоза, лимфомы, рака кожи, рака пищевода, рака желудка, астроцитарно-клеточного рака, рака эндометрия, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака почек, рака легких, рака печени, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы и рака яичника.

23. Применение по пп.18-21, где фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из фиброза легких, такого как идиопатический фиброз легких и кистозный фиброз, фиброза почек, цирроза печени, фиброза эндокарда, фиброза средостения, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, прогрессирующего обширного фиброза, нефрогенного системного фиброза, болезни Крона, келоидных рубцов, инфаркта миокарда, склеродермии и артрофиброза.

24. Способ лечения человека, страдающего злокачественным новообразованием или имеющего риск его развития, который включает введение указанному человеку эффективного количества анти-CSF-1R антитела по любому из пп. 1-9 или композиции по п.17.

25. Способ по п.24, где указанное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака кости, колоректального рака, лейкоза, лимфомы, рака кожи, рака пищевода, рака желудка, астроцитарно-клеточного рака, рака эндометрия, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака почек, рака легких, рака печени, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы и рака яичника.

26. Способ лечения человека, страдающего фиброзным заболеванием или имеющим риск его развития, который включает введение указанному человеку эффективного количества анти-CSF-1R антитела по любому из пп.1-9 или композиции по п.17.

27. Способ по п.26, где фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из фиброза легких, такого как идиопатический фиброз легких и кистозный фиброз, фиброза почек, цирроза печени, фиброза эндокарда, фиброза средостения, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, прогрессирующего обширного фиброза, нефрогенного системного фиброза, болезни Крона, келоидных рубцов, инфаркта миокарда, склеродермии и артрофиброза.

Последовательности CA019_969 Ab

CDR-L1

LASEDIYDNLA SEQ ID NO:1

CDRL2

YASSLQD SEQ ID NO:2

CDR-L3

LQDSEYFWT SEQ ID NO:3

CDR-H1

GFSLTTYGMGVG SEQ ID NO:4

CDR-H2

NIWDDDKYYNPSLKN SEQ ID NO:5

CDR-H3

IGPIKYPTAPYRYFDF SEQ ID NO:6

Фиг. 1А

VL-область крысиного Ab 969 SEQ ID NO:7

DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY DNLAWYQKKP GKSPHLLIYY
 ASSLQDGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLES EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG
 GTKLELK

VL-область крысиного Ab 969 SEQ ID NO:8

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga
 aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac gataatttag
 cgtggtacca gaagaagcca ggaaaatctc ctcacctcct catctattat
 gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg gcagtggatc
 tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct gaagatgctg
 cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac gttcggtgga
 ggcaccaagc tggattgaa a

VL-область крысиного Ab 969 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой
 и набранной курсивом SEQ ID NO:9

MGVPTQLLVL LLLWITDAIC DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY
 DNLAWYQKKP GKSPHLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLES
 EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG GTKLELK

VL-область крысиного Ab 969 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой
 и набранной курсивом SEQ ID NO:10

atgggtgtcc ccactcagct cttgggtgttg ttgctgctgt ggattacaga
tgccatatgt gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat
 ctctgggaga aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac
 gataatttag cgtggtacca gaagaagcca ggaaaatctc ctcacctcct
 catctattat gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg
 gcagtggatc tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct
 gaagatgctg cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac
 gttcggtgga ggcaccaagc tggattgaa a

VH-область крысиного Ab 969 SEQ ID NO:11

QVTLKESGPG ILQPSQTLISL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPSGKGLEWL
 ANIWDDDKY YNPSLKNRLT ISKDTSNNA FLKLTNVHTS DSATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYFDWGPVT MVTVS

VH-область крысиного Ab 969 SEQ ID NO:12

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac
 cctcagtcctg acttgcaact tctctgggtt ttcactgacc acttatggta
 tgggtgtggg ctggattcgt cagccttcag ggaagggctc ggagtggctg
 gcaaacattt ggtgggatga tgataagtat tacaatccat ctctgaaaaa
 ccggctcaca atctccaagg acacctcaa caaccaagca ttcctcaagg

Фиг. 1В

tcaccaatgt acacacttca gattctgcca catactactg tgctcggata
 gggccgatta aatacccgcac ggccccctac cggctactttg acttctgggg
 cccaggaacc atggtcaccg tctcgc

VH-область крысиного Ab 969 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:13

MDRLTSSFL LIVPAYVLSQ VTLKESGPGI LQPSQTLSTL CTFSGFSLTT
 YMGVGVWIRQ PSGKGLEWLA NIWVDDDKYY NPSLKNRLTI SKDTSNNQAF
 LKLTNVHTSD SATYYCARIG PIKYPTAPYR YDFWGPPTM VTVS

VH-область крысиного Ab 969 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:14

atggacagggc ttacttcctc attcctactg ctgattgtcc ctgcatatgt
cctgtctcag gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct
 cccagaccct cagtctgact tgcactttct ctgggttttc actgaccact
 tatgttatgg gtgtgggctg gattcgtcag ccttcaggga agggctctgga
 gtggctggca aacatttggg gggatgatga taagtattac aatccatctc
 tgaaaaaccg gctcacaatc tccaaggaca cctccaaca ccaagcattc
 ctcaagctca ccaatgtaca cacttcagat tctgccacat actactgtgc
 tcggataggg ccgattaat acccgacggc cccctaccgg tactttgact
 tctggggccc aggaaccatg gtcaccgtct cg

Фиг. 1В (продолжение)

V-область 969 gL7 SEQ ID NO:15

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
 ASSLQDGVPS RFGSGSGTD YLTISLQF EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
 GTKVEIK

V-область 969 gL7 SEQ ID NO:16

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga
 caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg
 catggatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
 gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
 cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
 ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtgt
 ggcaccaaag tggaaatcaa g

V-область 969 gL7 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:17

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY
 DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY ASSLQDGVPS RFGSGSGTD YLTISLQF
 EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG GTKVEIK

V-область 969 gL7 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:18

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
cgcaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca
 gtgtgggaga caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac
 gataacctgg catggatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct
 gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
 gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
 gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
 cttcgggtgt ggcaccaaag tggaaatcaa g

Легкая цепь (V + константная область) 969 gL7 SEQ ID NO:19

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
 ASSLQDGVPS RFGSGSGTD YLTISLQF EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQV
 LSSPVTKSFN RGEK

Легкая цепь (V + константная область) 969 gL7 SEQ ID NO:20

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga
 caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg

Фиг. 1С

catggatata gcagaaacct ggaaggctc ccaagctcct gatttattat
 gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
 cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
 ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtgt
 ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat
 cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggactgcc tctgttgtgt
 gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg
 gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
 cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaa
 cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

Легкая цепь (V + константная область) 969 gL7 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:21

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCLASEDIY
 DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISLQ
 EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
 SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

Легкая цепь (V + константная область) 969 gL7 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:22

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
gcgaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcga
 gtgtgggaga cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatctctac
 gataacctgg catggatata gcagaaacct ggaaggctc ccaagctcct
 gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
 gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
 gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
 cttcgggtgt ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat
 ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggactgcc
 tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca
 gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca
 cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
 ctgagcaaa cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt
 gt

Фиг. 1С (продолжение)

V-область 969 gH2 SEQ ID NO:23

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
 ANIWWDDDKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYDFWQGT MVTVS

V-область 969 gH2 SEQ ID NO:24

gaagtgcac tcaaggagtc tggaccgct ctggtgaaac caacccaaac
 actcactttg acatgtactt ttagtggctt ctcattgact acctatggaa
 tggcgtggg atggatcaga cagccactg gcaaggctct ggaatggctg
 gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccctg cctgaaaaa
 ccgctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg gtgctgacca
 tgacaaaat atgatccggt gacaccgcaa cctactactg cgcccgatt
 ggtccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttggg
 ccaagggaca atggttactg tctcg

V-область 969 gH2 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:25

MEWSWVFLFF LSVTGVHSE VTLKESGPAL VKPTQTLTLT CTFSGFSLTT
 YGMGVGWIR PPGKALEWLA NIWWDDDKY YNPSLKNRLTI SKDTSKNQV
 LTMNMDPVD TATYYCARIG PIKYPTAPYR YDFWQGT MVTVS

V-область 969 gH2 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:26

atggagtgg cctgggtgtt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccgggtt
ccactccgaa gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa
 cccaaacact cactttgaca tgaactttta gtggcttctc attgactacc
 tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag ccacctggca aggccttgga
 atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat aaccctccc
 tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggtg
 ctgacctaga caaatatgga tccggttgac accgcaacct actactcgc
 ccgcatgggt cccataaagt accctacggc acctaccga tatttcgact
 tttggggcca agggacaatg gttactgtct cg

Тяжелая цепь (V + константная область-hu IgG4P) 969 gH2 SEQ ID NO:27

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
 ANIWWDDDKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYDFWQGT MVTSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA
 LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS
 SLGKTITCN VDHKPSNTKV DKRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QFNSTYRVVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKQPR

Фиг. 1D

EFQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT
 PVLDSGDSF FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HTQKSLSL
 LGK

Тяжелая цепь (V + константная область-hu IgG4P, экзоны подчеркнуты)
 969 gH2 969 gH2 SEQ ID NO:28

gaagtgcac tcaaggagtc tggaccgct ctgggaaac caaccsaac
actcactttg acatgtactt ttagtgctt ctcattgact acctatgaa
tggcgctgg atggatcaga cagccactg gcaaggctct ggaatggctg
gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccgct cctgaaaa
ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aatcaagtg gtgctgacca
tgacaaatg ggtaccgctt gacaccgca cctactactg cccccgatt
ggtccataa agtaccctac ggcacctac cgatatttcg acttttggg
caaagggaca atggttactg tctcagcgc tctacaaaag gcccacccg
tcttcccct ggcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgct
ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccggtga cgggtctgtg
gaactcagg gccctgacca ggcgctgca caccttcccg gctgtcctac
agtcctcagg acttactcc ctacagcgg tggtagccgt gccctccagc
agcllggca cgaagaccla caccctgcaac glagalcaca agcccagcaa
caccaagggtg gacaaagag ttggtgagag gccagcacag ggaggagg
tgctgtgctg aagccaggct cagccctcct gcctggacgc accccggtg
tgacgcccc gccagggca gcaaggcatg ccccatctgt ctctcacc
ggaggcctct gaccaccca ctcatgcca gggagagggt ctttggatt
tttccaccag gctccggca gccacaggct ggtgcccct acccaggcc
ctgcgcatac agggcgaggt gctgcgctca gacctgcaa gagccatct
cgggaggacc ctgcccctga cctaagcca ccccaaggc caaactctcc
actcctcag ctacagacc ttctctctc ccagatctga gtaactccca
atcttctctc tgcagagtc aatatggtc ccccatgccc accatgccc
gtaagccaa cccaggcctc gccctccag tcaaggcgg acaggtgccc
tagagtatgc tgcattcagg gacagggccc agccgggtgc tgacgatcc
actcctctct ctctcagc acctgagttc ctggggggac catcagttt
cctgttccc ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctg
aggtcacgtg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagacc caggtccag
tcaactggt acgtgagtg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagg
cgggagagag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg
tctgcacca ggaactgctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc
aacaaaggcc tcccctcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaag
tgggaccac ggggtgagag gccacatg acagaggtca gctcggccca
ccctctgccc tgggagtgac cgctgtgcca acctctgtcc ctacaggcca
gcccagagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatccag gaggagatga
caaagaacca ggtcagcctg acctgctgg tcaaggcct ctaccacagc
gacatcgccg tggagtggga gagcaatgg cagccggaga acaactaca
gaccacgct cccgtgctg actccgacgg ctctctctc ctctacagca
ggctaaccgt gacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcagc
tccgtgatgc atgagctct gcacaaccac tacacacaga agagcctct
cctgtctctg ggtaaa

Фиг. 1D (продолжение)

Тяжелая цепь (V + константная область-huIgG4P) 969 gH2 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:29

MEWSWVLF LF LSVTTGVHSE VTLKESGPAL VKPTQLTLT CTFSGSLTT
 YMGVGIRO PFGKALEWLA NIWDDDKRY NPSLKNRLTI SKDTSKNQV
 LMTNMDPVD TATYCARIG PIKYPTAPYR YDFWQGTMT VVSSASTKG
 PSVFLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSNWNSA LSGVHTFPA
 VLQSSGLYSL SSVVTVFSS LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
 CPPCPAPEFL GGSVFLFPP KPKDLMISR TPEVTCVVD VSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDNLN GKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTP FVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
 SVMHEALHNN YTKSLSLSL GK

Тяжелая цепь (V + константная область-huIgG4P, экзоны подчеркнуты) 969 gH2 с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и набранной курсивом SEQ ID NO:30

atgagtggt cctgggtgt tctgttctc ctgagtatga ccaccgggt
ccactccgaa gtgactca aggagtctg acccgtctg gtgaaacaa
cccaaacact cactttgaca tgaacttta tggcttctc attgactacc
tatggaatgg cgtgggatg gatcagacag ccacctgga aggtctgga
atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat aaccgtccc
tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaa tcaagtgtg
ctgaccatga caaataatga tcccgttgac accgcaacct actactgctc
cgcatgggt cccataaagt acctacagcc accttaccga tattctgact
tttggggcca agggacaatg gttactgtct cgagcgtctc tacaaggcc
ccatccgtct tcccctgct gccctgctcc aggaagcact ccgagagcac
agccgcccgt ggtgctctg tcaaggacta cttcccga cgggtgacgg
tgtcgtgaa ctcaggcctc ctgaccagc cgtgacac ctcccggct
gtcctacagt cctcagact ctactccctc agcagcgtg tgaccgtgcc
ctccagcagc tgggacag agacctacac ctgcaacgta gatcacaagg
ccagcaacac caaggtggac aagagagttg gtgagagccc agcacaggga
gggaggggt ctgctggaag ccaggctcag cctcctgctc tggacgacc
ccgctgtgac agccccagc cagggcagca aggcattccc catctgtctc
ctaccccga ggcctctgac caccocactc atgcccagg agagggtctt
ctgattttt ccaccaggct ccggcagcc acaggtctga tgcctcacc
ccaggccctg cgcatacag ggcaggtgct gcgctcagc ctgccaagag
ccatctcgg gaggaccctg cccctgacct aagcccacc caaaggccaa
actctccact cctcagctc agacacctc tctctccca gatctgagta
actcccaatc ttctctctc agagtccaaa tatggtccc catgcccacc
atgcccaggt aagccaacc aggcctgctc ctccagctca aggggggaca
ggtgcccag agtagcctc atccaggac agcccagc cgggtgctga
cgatccacc tccatctct cctcagcacc tgagttctg gggggaccat
agctctctc gttccccca aaacccaagg acactctcat gatctcccgg
accctgagg tccgtgct ggtggtgac gtgagccag aagaccgga
ggtccagttc aactgtaag tggatggct gagggtgat aatgccaaga

Фиг. 1D (продолжение)

caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggaaggagt acaagtgcaa
ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag
ccaaaggtgg gacccacggg gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct
cggcccacc tctgccttg gagtgaccgc tgtgccaacc tctgtcccta
cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta
ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggag ccggagaaca
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc
tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt
ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga
gcctctccct gtctctgggt aaa

Фиг. 1D (продолжение)

Акцепторная каркасная область человеческого VK1 2-1-(1) O12 JK4 SEQ ID NO: 31

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQSI SYLNWYQQK GKAPKLLIYA
 ASSLQSGVPS RFSGSGGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVEIK

Акцепторная каркасная область человеческого VK1 2-1-(1) O12 JK4 SEQ ID NO: 32

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
 cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatntaa
 attggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct
 gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtggatc
 tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct gaagatnttg
 caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga
 gggaccaagg tggagatcaa a

Акцепторная каркасная область человеческого VH2 3-1 2-70 JH3 SEQ ID NO: 33

QVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TSGMRVSWIR QPPGKALEWL
 ARIDWDDDKF YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 AFDIWGGQTM VTVS

Акцепторная каркасная область человеческого VH2 3-1 2-70 JH3 SEQ ID NO: 34

caggtcacct tgaaggagtc tggctctgcg ctgggtgaaac ccacacagac
 cctcacactg acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actagtggaa
 tgcgtgtgag ctggatccgt cagccccag ggaaggccct ggagtggctt
 gcacgcattg attgggatga tgataaattc tacagcaccat ctctgaagac
 caggtcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggty gtccttacia
 tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata
 gcttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct ct

Фиг. 1E

Аминокислотная последовательность для CSF-1R SEQ ID NO:35

MGPGVLLLLL VATAWHQGGI FVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW
 DGPPSPHWTLYSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY
 VKDPPARPNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVVRGRPLMR
 HTNYSFSPFWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGKRVMSIS IRLKVKQVIP
 GPPALTLVPA ELVVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVLQHN NTKLAI PQQS
 DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQGHKSTS MFFRVVESAY
 LNLSSQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSHDQPEPK
 LANATTKDITY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY
 PPEVSVIWTI INGSGLLCA ASGYPOPNTV WLQCSGHTDR CDEAQLQVW
 DDPYPEVLSQ EPFHKVTQVS LLTVETLEHN QTYECRAHNS VSGSGSWAFIP
 ISAGANTHPP DEFLFTPVVV ACMSIMALLL LLLLLLLYKY KQKPKYQVRW
 KIIESYEGNS YTFIDPTQLP YNEKWEFPRN NLQFGKTLGA GAFGKVVVAT
 AFGLGKEDAV LKVAVKMLKS TAHADEKEAL MSELKIMSHL GQHENIVNLL
 GACTHGGFVL VITEYCCYGD LLNFLRRKAE AMLGPSLSPG QDPEGGVYK
 NIHLEKKYVR RDSGFSSQGV DTYVEMRPVS TSSNDSFSEQ DLDKEDGRPL
 ELRDLHFSS QVAQGMFLA SKNCIHRDVA ARNVLLTNGH VAKIGDFGLA
 RDIMNDSNYI VKGNARLPVK WMAPESEIFDC VYTVQSDVWS YGILLWEIFS
 LGLNFYPGIL VNSKPYKLVK DGYQMAQPAF APKNIYSIMQ ACWALEPTHR
 PTFQICISFL QEQAQEDRRE RDYTNLPSSS RSGSGSSSSS ELEEESSEH
 LTCCEQGDIA QPLLQPNYQ FC

Аминокислотная последовательность для CSF-1R SEQ ID NO:36

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
 STEPGLDPLGGSAAIHLYVKDPPARPNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDVPVLEAGVSLVRVVRGRP
 LMRHTNYSFSPFWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGKRVMSISIRLKVQKVIIPGPPALTLVPAE
 LVVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAI PQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
 YSCVASNVQGHKSTSMFFRVV

Аминокислотная последовательность для CSF-1R SEQ ID NO:37

MRHTNYSFSPFWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGKRVMSISIRLKVQK

Аминокислотная последовательность для CSF-1R (положения SNP V32G, A245S, H247P, V279M, подчеркнуты)

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
 STEPGLDPLGGSAAIHLYVKDPPARPNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDVPVLEAGVSLVRVVRGRP
 LMRHTNYSFSPFWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGKRVMSISIRLKVQKVIIPGPPALTLVPAE
 LVVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIHQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
 YSCVANSVQGHKSTSMFFRVVVEAYLNLSSQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFNWTYLG
 PFSHDQPEPKLANATTKDITYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPE
 VSVIWTIINSGGLLCAASGYPOPNTVWLQCSGHTDRCDQAQVQLQVWDDPYPEVLSQEPFHKVT
 VQSLTLTVETLEHNQTYECRAHNSVSGSGSWAFIPISAGANTHPPPE

Фиг. 1F

Привитая легкая цепь 969

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105
Легкая цепь 969	DIQMTQSPASLSASLGTETVSI	LASEDIYDNL	AWYQKPKGKSPHLLIY	YASSLQD	GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLESDAATYFC	LQDSEY	PWTFGGG	TKLEIK														
VK1 2-1-(1) O12	DIQMTQSPASLSASVGRVITTC	RASQSISSYL	NWYQKPKGKAPKLLIY	AASSLQD	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFC	QQSYSTPLT	FGG	TKVEIK														
969 gL7	DIQMTQSPASLSASVGRVITTC	LASEDIYDNL	AWYQKPKGKAPKLLIY	YASSLQD	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFC	LQDSEY	PWTFGGG	TKVEIK														

Надписи

969 = Последовательность варибельной области легкой цепи крысиного антитела
 969 gL7 = Гуманизованная привитая варибельная область легкой цепи антитела 969, полученная с использованием VK1 2-1-(1) O12 плюс JK4 человеческой зародышевой линии в качестве акцепторной каркасной области

CDR показаны жирным шрифтом/подчеркнуты
 Донорный остаток показан жирным шрифтом/курсивом и выделен: Y71

Фиг. 2A

Привитая тяжелая цепь 969

	1	5	10	15	20	25	30	ab	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	abc	85	90	95	105	110
Тяжелая цепь 969	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFS	GFSLTTYGMGVG	WIRQPSGKLEWLANI	NIWDDDKYINPSLKN	RLTIISKDTSNNQAFKLTNTVHTSDSATYFCAR	IGPIKYPTAPYRFD	WGEG	TMVTYS																
VH2 3-1 2-70	QVTLKESGPAVKPTQTLTCTCTFS	GFSLSTSGMRVS	WIRQPPGKALEWLANI	RIWDDDKFYSTSLKT	RLTIISKDTSKNQVLLTMTNMDPVDATATYFCAR	I-----AFDV	WGQ	TMVTYS																
969gH2	EVTLKEGSPALVKPTQTLTCTCTFS	GFSLTTYGMGVG	WIRQPSGKALEWLANI	NIWDDDKYINPSLKN	RLTIISKDTSKNQVLLTMTNMDPVDATATYFCAR	IGPIKYPTAPYRFD	WGQ	TMVTYS																

Надписи

969 = Последовательность варибельной области тяжелой цепи крысиного антитела
 969 gH2 = Гуманизованная привитая варибельная область тяжелой цепи антитела 969, полученная с использованием VH2 3-1 2-70 плюс JH3 человеческой зародышевой линии в качестве акцепторной каркасной области

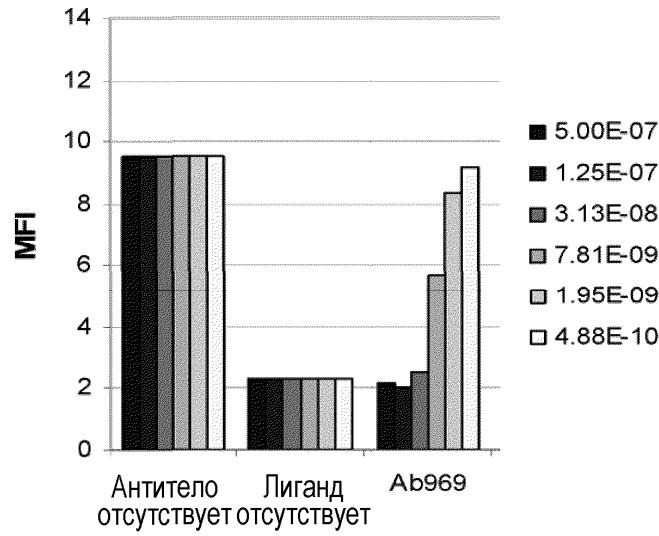
CDR показаны жирным шрифтом/подчеркнуты

Фиг. 2B

SEQ ID NO: 39

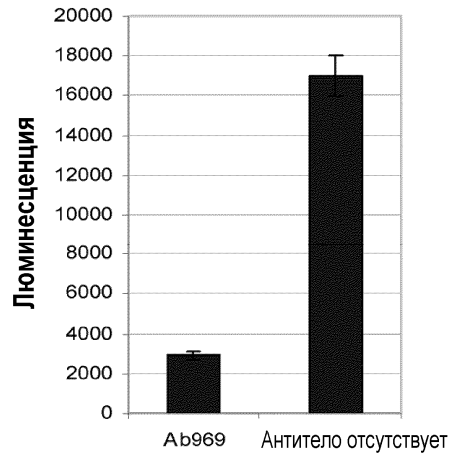
MGPGLVLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW DGPPSPHWTLL YSDGSSSILS
 TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPAEPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL
 VRVGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA
 ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVLQHN NTKLAIPOQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA
 SNVQGHKSTS MFFRVVESAY LNLSSQNLII QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK
 LANATTKDITY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWF INGSGTLLCA
 ASGYPPQNVTL WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS
 VGSGSWAFIP ISAGATHPP DE

Фиг. 3



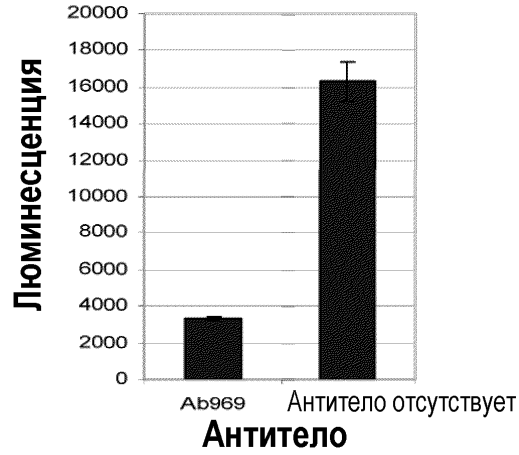
Антитело

Фиг. 4

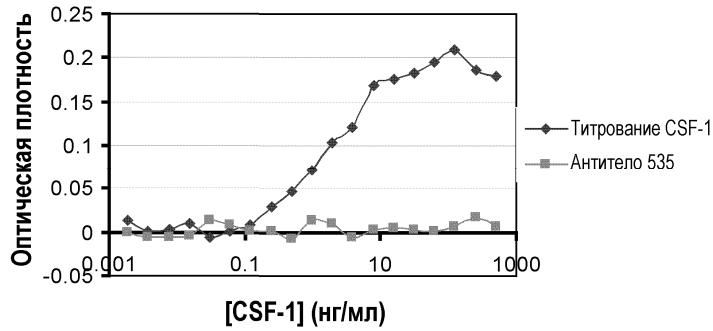


Антитело

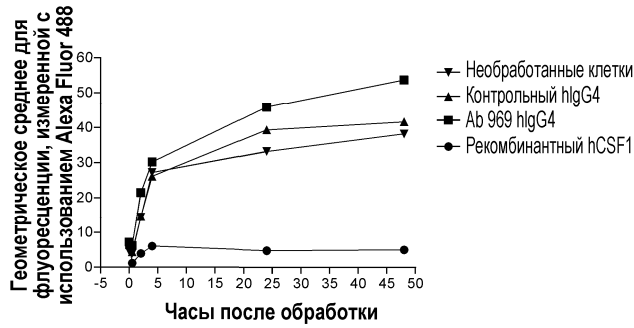
Фиг. 5А



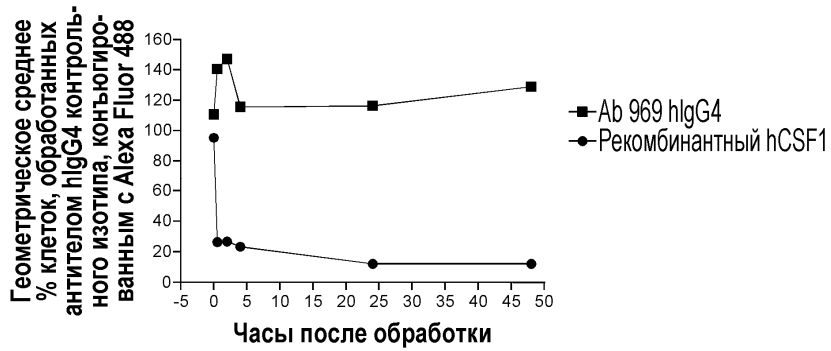
Фиг. 5B



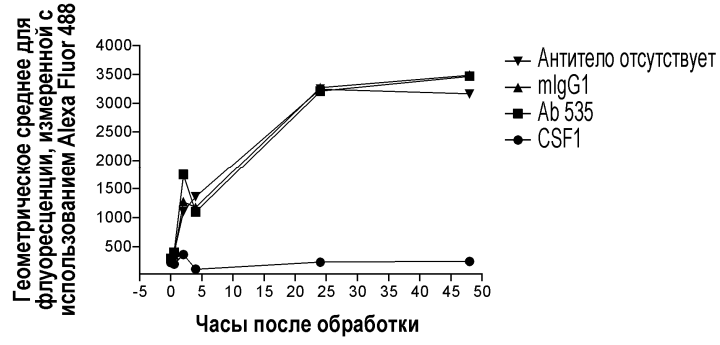
Фиг. 6



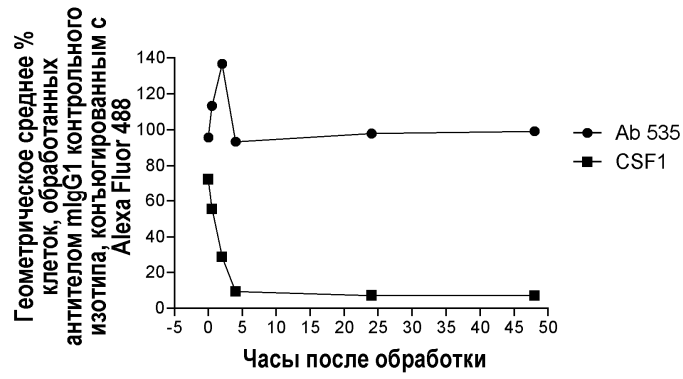
Фиг. 7



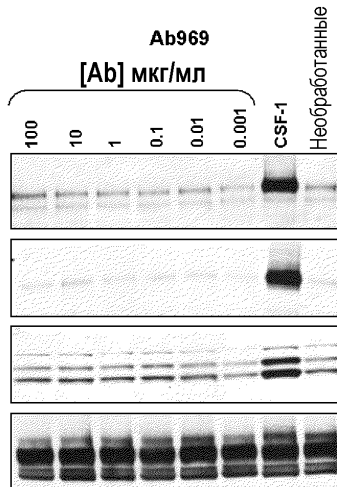
Фиг. 8



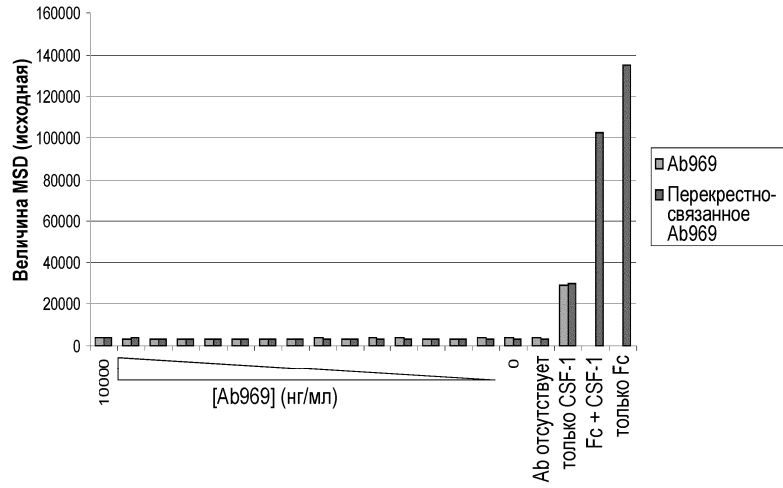
Фиг. 9



Фиг. 10

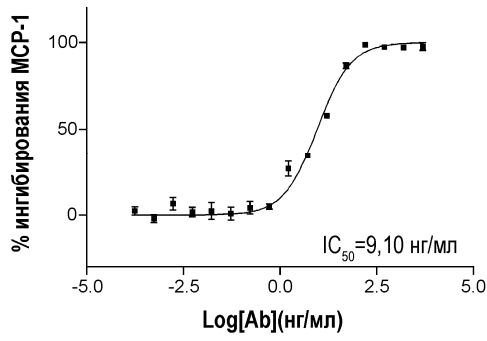


Фиг. 11

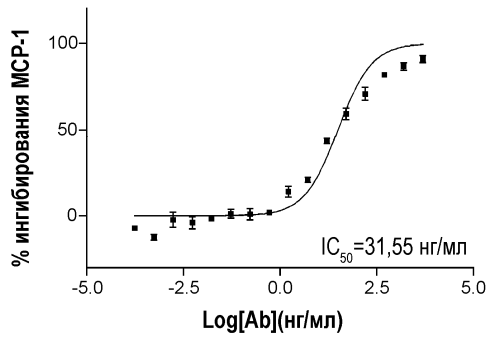


Фиг. 12

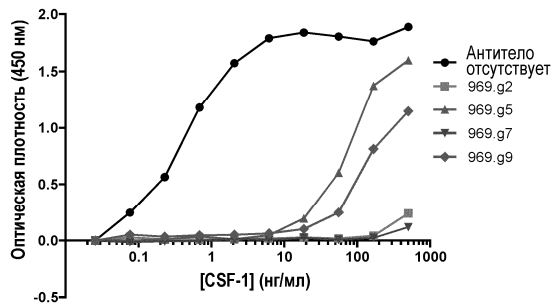
Ab969.g0 CSF1



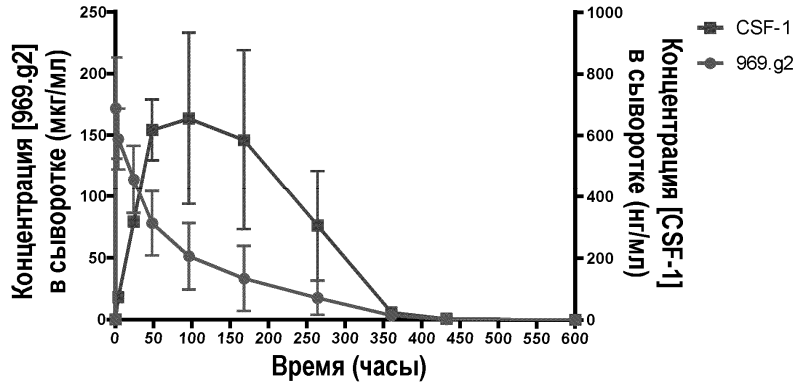
Ab969.g5 CSF1



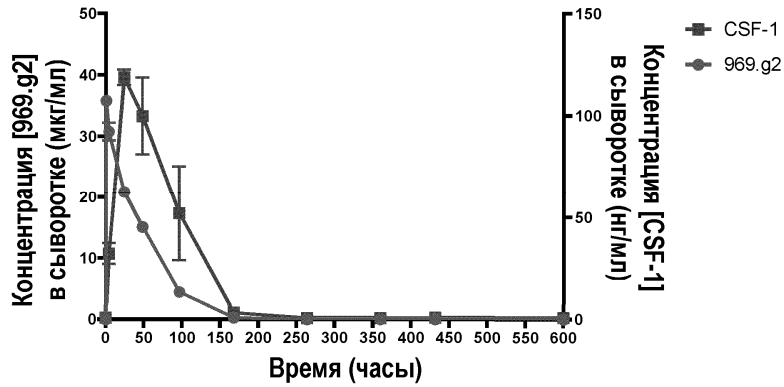
Фиг. 13



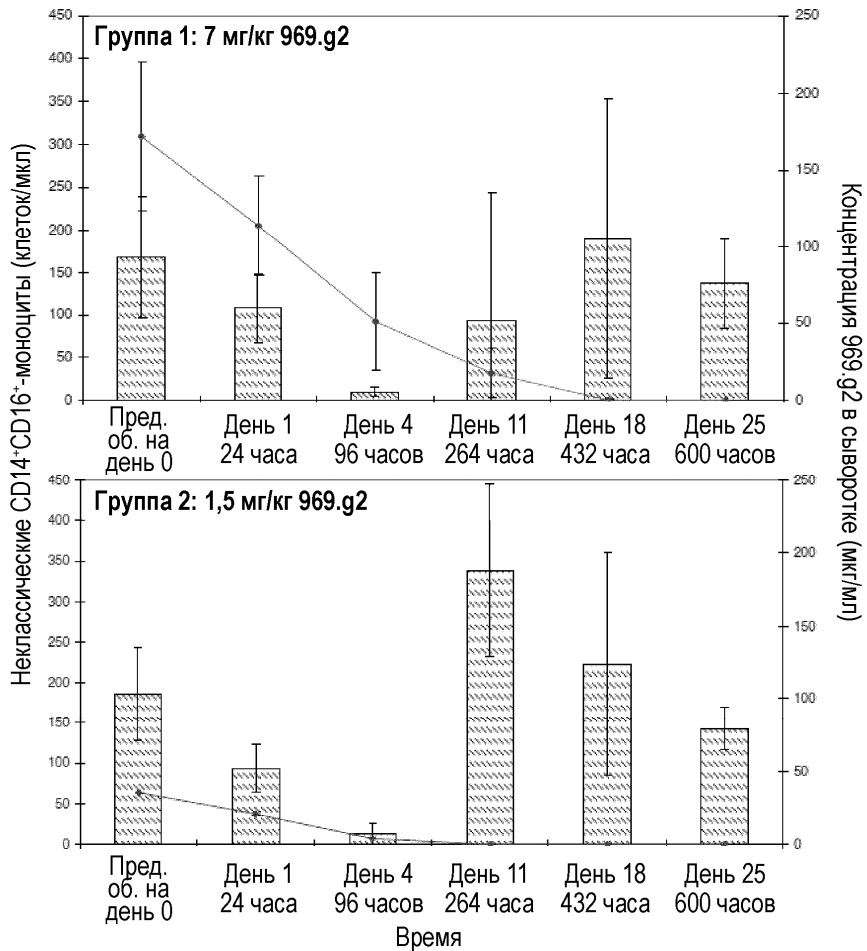
Фиг. 14



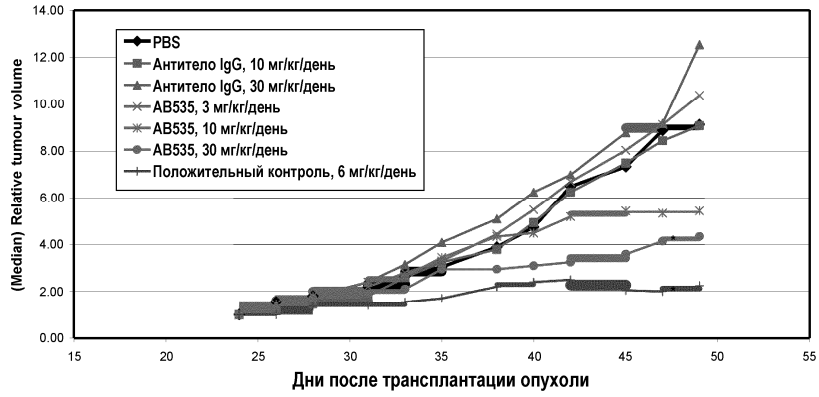
Фиг. 15А



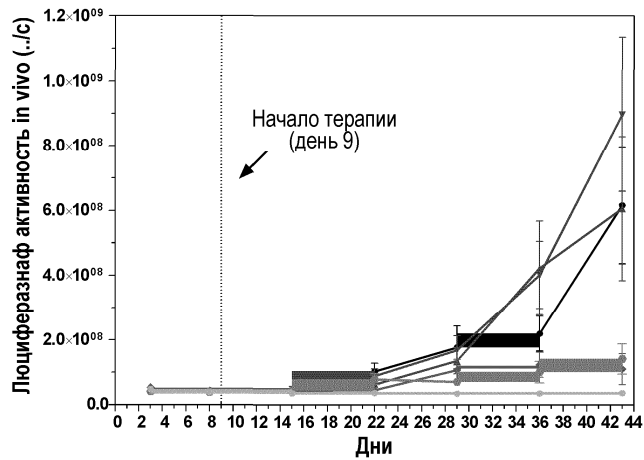
Фиг. 15В



Фиг. 15С

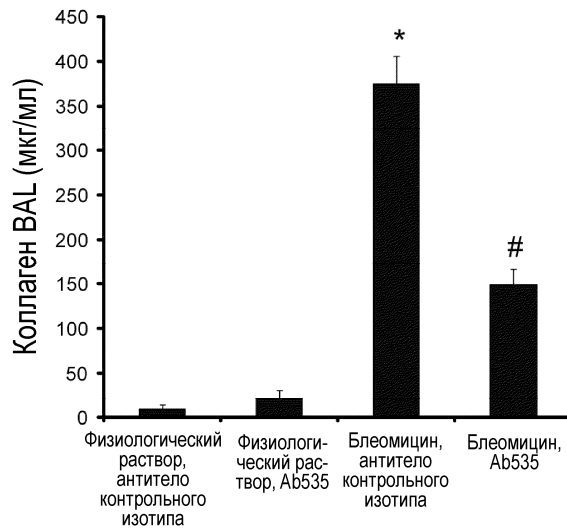


Фиг. 16

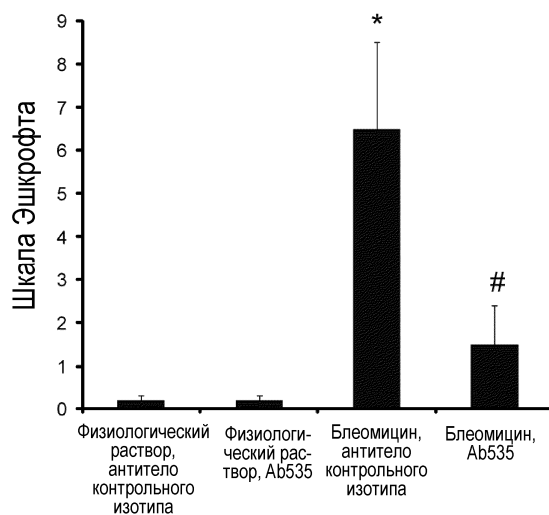


- Группа 1: Контроль-носитель (PBS) s.c., 3 раза в неделю на дни 9-42 (n=12)
- Группа 2: 30 мг/кг контрольного антитела, s.c., 3 раза в неделю на дни 9-42 (n=12)
- Группа 3: 10 мг/кг контрольного антитела, s.c., 3 раза в неделю на дни 9-42 (n=12)
- Группа 4: 30 мг/кг антитела Ab535, s.c., 3 раза в неделю на дни 9-42 (n=12/9)
- Группа 5: 10 мг/кг антитела Ab535, s.c., 3 раза в неделю на дни 9-42 (n=11/10)
- Группа 6: 360 мг/кг положительного контроля, i.v., один раз в неделю в течение четырех недель (на дни 10, 17, 24 и 31) (n=12/11)

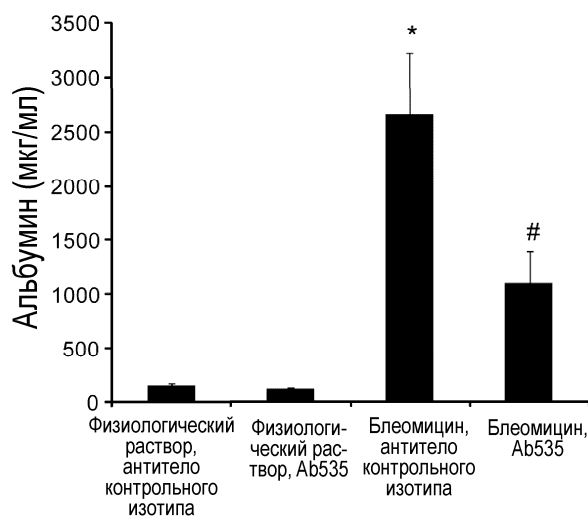
Фиг. 17



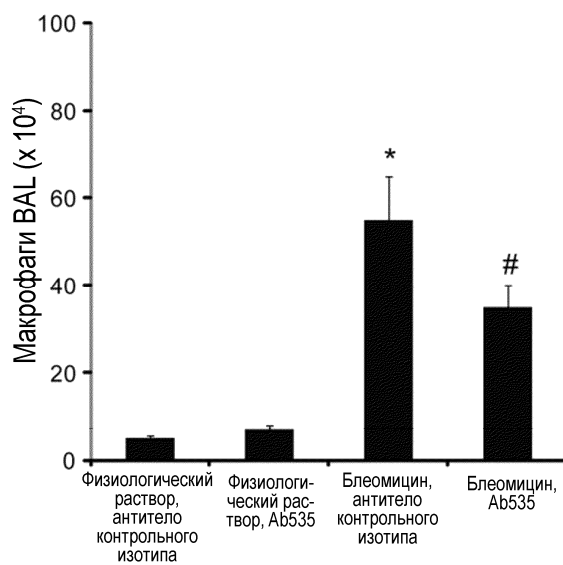
Фиг. 18А



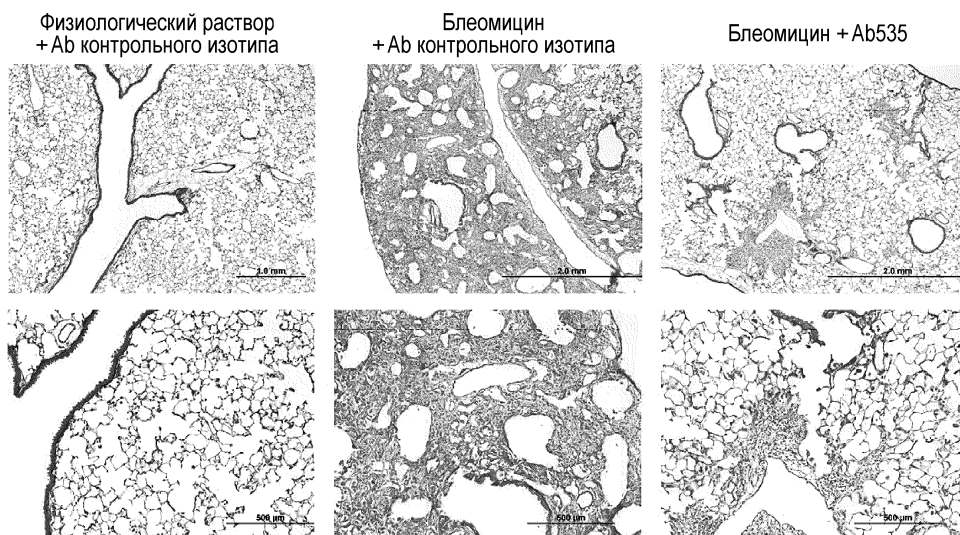
Фиг. 18В



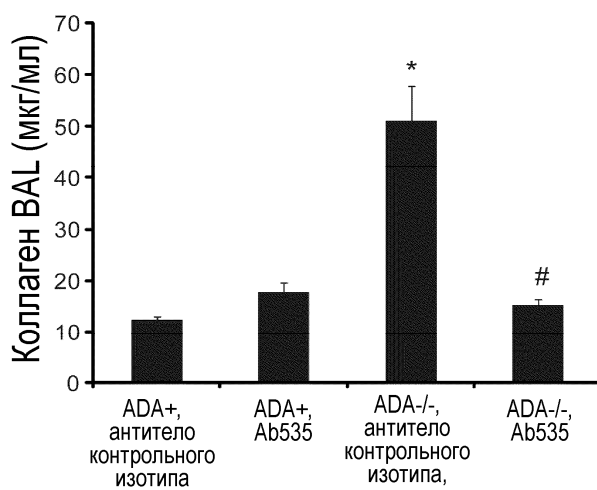
Фиг. 18С



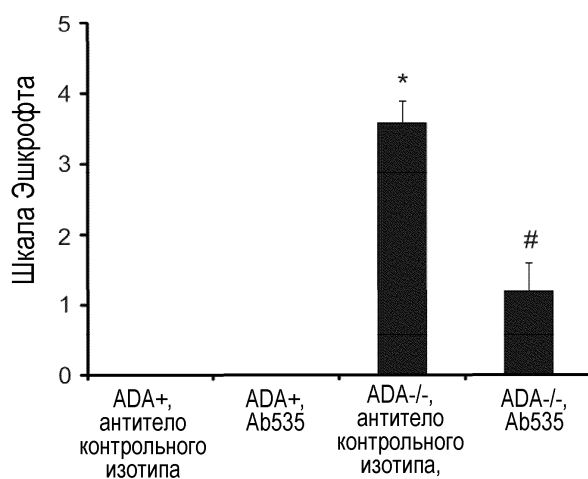
Фиг. 18D



Фиг. 19

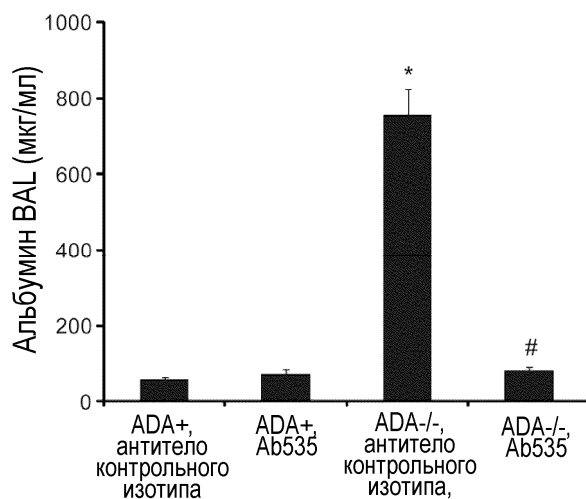


Фиг. 20А

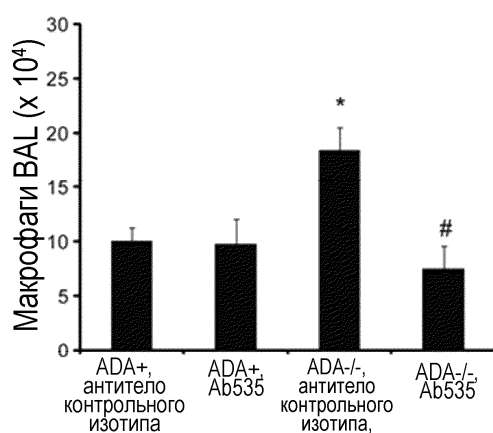


Фиг. 20В

036255

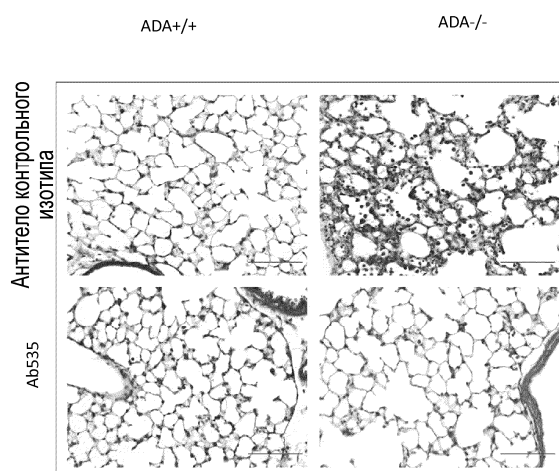


Фиг. 20С



* Означает значимое отличие от ADA+/-мышей (дикого типа);
 # Означает значимое отличие от ADA-/-мышей, обработанных антителом контрольного изогиа ($p \leq 0,05$)

Фиг. 20D



Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2