

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041397**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.19

(21) Номер заявки
201790336

(22) Дата подачи заявки
2015.08.06

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К АНГИОПОЭТИНПОДОБНОМУ БЕЛКУ 4 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/034,409**

(32) **2014.08.07**

(33) **US**

(43) **2017.06.30**

(86) **PCT/IB2015/055986**

(87) **WO 2016/020880 2016.02.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Траугер Джон, Вознесенский Андрей
Игоревич (US), Сплавски Игорь (PL),
Сиб Режи (FR)**

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

(56) E.-C. LEE ET AL.: "Identification of a New Functional Domain in Angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) Involved in Binding and Inhibition of Lipoprotein Lipase (LPL)", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, № 20, 15 May 2009 (2009-05-15), p. 13735-13745, XP055035574, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M807899200, fig. 2, abstract

WO-A1-2006074228

WO-A2-2011079257

(57) Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, связывающимся с ангиопоэтинподобным белком 4 человека (далее иногда называемым "ANGPTL4"), и к фармацевтическим композициям и способам лечения, включающим указанные антитела.

041397

B1

041397

B1

Уровень техники

Ангиопоэтинподобный белок 4 (ANGPTL4) является членом ангиопоэтинподобного семейства секретируемых белков. Он представляет собой гомоолигомерный белок, способный образовывать димеры и тетрамеры, экспрессируемый различными типами клеток, включающими макрофаги, клетки жировой ткани, мышц и печени. ANGPTL4 также известен как печеночный фибриноген/ангиопоэтинродственный белок (HFARP) (Kim et al. (2000), (2000) *Biochem. J.*, 346:603-610); PPAR-гамма ангиопоэтинродственный белок (PGAR) (Yoon, et al. (2000), *Mol. Cell Biol.*, 20:5343-5349); и индуцированный голоданием фактор жировой ткани (FIAF) (Kerten et al. (2000), *J. Biol. Chem.*, 275:28488-28493). ANGPTL4 содержит N-концевой биспиральный домен и C-концевой фибриноген(FBN)-подобный домен (Kim et al. (2000), *Biochem. J.*, 346:603-610).

Липопротеинлипаза (LPL) играет центральную роль в метаболизме липопротеинов, которая включает в себя поддержание уровней липопротеинов в крови через тканеспецифичную регуляцию их активности. Биспиральная область в ANGPTL4, как известно, ингибирует LPL-опосредуемый клиренс триглицеридов (TG). Поэтому для всех мутаций ANGPTL4 с потерей функций (например, что показано у человека), генетических делеций (например, что показано на трансгенных мышах) и ингибирующих антител (например, как показано на мышах и яванских макаках) наблюдается снижение уровня триглицеридов в плазме крови. Кроме того, также известно, что анти-ANGPTL4 антитела активируют LPL. Напротив, инъекционное введение ANGPTL4 в организм мышей приводит к быстрому увеличению триглицеридов в кровотоке, и это происходит с более высокой скоростью, чем при инъекционном введении ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3) (Yoshida et al. (2002), *J. Lipid Res.*, 43:1770-1772).

Анти-ANGPTL4-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, инициируют, способствуют или усиливают активацию LPL, например, путем блокирования ANGPTL4-ингибирования LPL, тем самым снижая уровень триглицеридов в плазме крови. Эти антитела, как ожидается, будут предупреждать и смягчать острые и хронические проявления заболеваний, характеризующиеся повышенным уровнем триглицеридов, например первичную дислипидемию, гипертриглицеридемию, метаболический синдром, диабет второго типа и т.п.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, связывающимся с ангиопоэтинподобным белком 4 человека (далее иногда называемым "ANGPTL4") и к включающим их фармацевтическим композициям и способам лечения.

Выделенные анти-ANGPTL4 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, связывают ANGPTL4 с равновесной константой диссоциации (K_D) ниже или равной 100 пМ. Например, выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут связываться с ANGPTL4 человека с K_D ниже или равной 150 нМ, ниже или равной 50 нМ, ниже или равной 10 нМ, ниже или равной 750 пМ, ниже или равной 600 пМ, ниже или равной 500 пМ, ниже или равной 400 пМ, ниже или равной 300 пМ, ниже или равной 200 пМ, ниже или равной 100 пМ, ниже или равной 75 пМ, ниже или равной 65 мкМ, ниже или равной 60 пМ, ниже или равной 55 пМ. Более конкретно выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут также связываться с ANGPTL4 человека с K_D ниже или равной 45 пМ, измеренной с помощью методов анализа кинетики связывания ForteBio, или ниже или равной 24 пМ, измеренной с помощью анализа равновесного титрования в растворе (SET); и могут также связываться с ANGPTL4 яванского макака с K_D ниже или равной 87 пМ, измеренной с помощью методов анализа кинетики связывания ForteBio, или ниже или равной 22 пМ, измеренной с помощью SET.

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с ANGPTL4 человека. Настоящее изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с ANGPTL4 и дополнительно конкурируют за связывание с антителом, описанным в табл. 1. Настоящее изобретение также дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 1.

Аффинность связывания выделенных антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, может быть определена путем равновесного титрования в растворе (SET). Способы SET известны в данной области техники и описаны более подробно ниже. В качестве альтернативы аффинность связывания выделенных антител или фрагменты, описанных в данном документе, может быть определена с помощью анализа Biacore. Способы кинетических анализов Biacore известны в данной области техники и описаны более подробно ниже.

Выделенные анти-ANGPTL4 антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть использованы для ингибирования связывания ANGPTL4 с липопротеинлипазой (LPL) с EC_{50} ниже или равной 100 нМ, ниже или равной 50 нМ, ниже или равной 35 нМ, ниже или равной 25 нМ, ниже или равной 10 нМ или ниже или равной 3 нМ.

Выделенные анти-ANGPTL4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы для снижения уровней триглицеридов (TG) в кровотоке.

Выделенные анти-ANGPTL4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в дан-

ном документе, могут представлять собой моноклональные антитела, человеческие или гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, Fv-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты или scFv-фрагменты и/или изотипы IgG.

Выделенные анти-ANGPTL4-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут также включать в себя структуру, в которой аминокислота была замещена в карманной области антитела из соответствующих последовательностей зародышевой линии VH или VL человека.

Другой аспект настоящего изобретения включает в себя выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, имеющие полноразмерные последовательности тяжелых и легких цепей гуманизированных антител, описанных в табл. 1. Более конкретно выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты могут иметь последовательности тяжелых и легких цепей из NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319.

Дополнительный аспект изобретения включает выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, имеющие последовательности вариативных доменов тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител, описанных в табл. 1. Более конкретно выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь последовательности вариативных доменов тяжелой и легкой цепей из NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые включают в себя CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112 и 132; CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113 и 133; и CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114 и 134, где выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с ANGPTL4 человека. В другом аспекте такое выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты дополнительно включают в себя CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142; CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143; и CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые включают в себя CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142; CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143; и CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144, где выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с ANGPTL4 человека.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают ANGPTL4, имеющим HCDR1, HCDR2, и HCDR3, и LCDR1, LCDR2, и LCDR3, где HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат SEQ ID NO: 7, 8, и 9, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержат SEQ ID NO: 17, 18 и 19; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат SEQ ID NO: 32, 33, и 34, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержат SEQ ID NO: 42, 43 и 44; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат SEQ ID NO: 52, 53 и 54, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержат SEQ ID NO: 62, 63 и 64; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат SEQ ID NO: 72, 73 и 74, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержат SEQ ID NO: 82, 83 и 84; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат SEQ ID NO: 92, 93 и 94, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержат SEQ ID NO: 102, 103 и 104; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат SEQ ID NO: 112, 113 и 114, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержат SEQ ID NO: 122, 123 и 124; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат SEQ ID NO: 132, 133 и 134, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержат SEQ ID NO: 142, 143 и 144.

Изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющим HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариативного домена тяжелой цепи из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариативного домена легкой цепи из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148 в соответствии с определением Чотия. В другом аспекте настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из последовательности вариативного домена тяжелой цепи из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из последовательности вариативного домена легкой цепи из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148 в соответствии с определением Кабата.

В одном аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты включают последовательность вариативного домена тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать последовательность вариативного домена легкой цепи, где вариативный домен тяжелой цепи и вариативный домен легкой цепи объединяются, образуя антигенсвязывающий участок для ANGPTL4. В частности, последовательность вариативного домена легкой цепи может быть выбрана из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148, где указанные выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связывают ANGPTL4.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые включают последовательность вариативного домена легкой цепи, выбранную из группы, со-

стоящей из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148, где указанные выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с ANGPTL4 человека. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать последовательность варибельного домена тяжелой цепи, где варибельный домен легкой цепи и варибельный домен тяжелой цепи, объединяются, образуя антигенсвязывающий сайт для ANGPTL4.

В частности, выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают ANGPTL4, могут иметь варибельные домены тяжелой и легкой цепей, содержащие последовательности SEQ ID NO: 13 и 23; 38 и 48; 58 и 68; 78 и 88; 98 и 108; 118 и 128; или 138 и 148 соответственно.

Кроме того, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые включают варибельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138, где указанное антитело связывается с ANGPTL4. В одном аспекте выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты также включают варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148. В еще одном аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеют HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с определением Кабата, описанные в табл. 1.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, имеющим варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148, где указанное антитело связывает ANGPTL4.

В другом аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ANGPTL4, могут иметь тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120 и 140. Выделенное антитело может также включать легкую цепь, которая может объединяться с тяжелой цепью с образованием антигенсвязывающего сайта для ANGPTL4 человека. В частности, легкая цепь может иметь последовательность, содержащую SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130 и 150. В частности, выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают ANGPTL4, могут иметь тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие последовательности SEQ ID NO: 15 и 25; 28 и 25; 40 и 50; 60 и 70; 80 и 90; 100 и 110; 120 и 130; или 140 и 150 соответственно.

Кроме того, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые включают тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 90% идентичности по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120 и 140, где указанное антитело связывается с ANGPTL4. В одном аспекте выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты также включают легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90% идентичности по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130 и 150.

Кроме того, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые включают легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90% идентичности по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130 и 150, где указанное антитело связывает ANGPTL4.

Кроме того, изобретение относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые конкурируют за связывание с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, описанными в данном документе, например, с гуманизированными антителами NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318 и NEG319. В одном варианте осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению способны ингибировать более чем на 50% связывание ANGPTL4 гуманизированным антителом, выбранным из NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318 и NEG319, где два антитела или антигенсвязывающих фрагмента присутствуют в эквимоллярных концентрациях.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению способны ингибировать более чем на 80% связывание ANGPTL4 гуманизированным антителом, выбранным из NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318 и NEG319, где два антитела или антигенсвязывающих фрагмента присутствуют в эквимоллярных концентрациях. В других вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению способны ингибировать более чем на 85% (или 90, 95, 98 или 99%) связывание ANGPTL4 гуманизированным антителом, выбранным из NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318 и NEG319, где два антитела или антигенсвязывающих фрагмента присутствуют в эквимоллярных концентрациях.

Изобретение также относится к композициям, содержащим выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе. А также изобретение относится к композициям антител в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. В частности, настоящее изобретение дополнительно включает фармацевтические композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающие фрагменты из табл. 1, такие как, например, гуманизированные антитела NEG276,

NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим комбинацию двух или нескольких из выделенных антигенов или их антигенсвязывающих фрагментов из табл. 1.

Изобретение также относится к последовательности выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей вариативный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138. В частности, нуклеиновая кислота имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 27, 39, 59, 79, 99, 119 и 139. В еще одном аспекте настоящего изобретения этой последовательностью являются SEQ ID NO: 14, 27, 39, 59, 79, 99, 119 или 139.

Изобретение также относится к последовательности выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей вариативный домен легкой цепи, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148. В частности, нуклеиновая кислота имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 31, 49, 69, 89, 109, 129 и 149. В еще одном аспекте настоящего изобретения этой последовательностью являются SEQ ID NO: 24, 31, 49, 69, 89, 109, 129 или 149.

Изобретение также относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую полипептид, который включает вариативный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности по последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148.

Изобретение также относится к вектору, который включает в себя одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, которая включает рекомбинантную последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела, описанного выше, и вторую рекомбинантную последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь антитела, описанного выше, где указанные последовательности ДНК функционально связаны с промотором и способны экспрессироваться в клетке-хозяине. Предполагается, что антитело может быть гуманизированным антителом. Также предполагается, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, кроме человека.

Предполагается, что клетка представляет собой клетку человека. Дополнительно предполагается, что клетка находится в субъекте. В одном варианте осуществления предполагается, что клетка является эндотелиальной клеткой. В других вариантах осуществления настоящего изобретения клетка может быть одной или несколькими из клеток жировой ткани, мышц и печени. Кроме того, дополнительно предполагается, что субъектом является человек.

Изобретение также относится к способу лечения, улучшения или предупреждения ANGPTL4-ассоциированных расстройств у пациента, причем способ включает в себя стадию введения пациенту эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе. В одном аспекте ANGPTL4-ассоциированное расстройство связано с гипертриглицеридемией (например, выраженной гипертриглицеридемией (например, с концентрацией триглицеридов в плазме >500 мг/дл), гипертриглицеридемией, связанной с ожирением и гипертриглицеридемией V типа). В других аспектах ANGPTL4-ассоциированное расстройство связано с первичной дислипидемией, метаболическим синдромом, диабетом II типа. Предполагается, что пациентом является человек.

Любое из вышеуказанных выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов могут представлять собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты.

Определения.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, какое обычно понимают под ними средние специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение.

Термины "белок ANGPTL4", или "антиген ANGPTL4", или "ANGPTL4" используются взаимозаменяемо и относятся к ангиопоэтинподобному белку 4 (ANGPTL4) из разных биологических видов. Например, ANGPTL4 человека имеет последовательность, приведенную в табл. 1 (SEQ ID NO: 1) и описан в предыдущих статьях и литературе (Nature, vol. 386, p. 73-77, 1997; Genomics, vol. 54, № 2, p. 191-199, 1998; Biochem. J., vol. 339, part 1, p. 177-184, 1999; номер доступа в Genbank: NP 002534). ANGPTL4 содержит N-концевой биспиральный домен и C-концевой фибриноген (FBN)-подобный домен (Kim et al. (2000), Biochem. J., 346:603-610). Он представляет собой гомоолигомерный белок, способный образовывать димеры и тетрамеры, экспрессируемый различными типами клеток, включающими макрофаги, клетки жировой ткани, мышц и печени, и, как известно, ингибирующий LPL-опосредуемый клиренс триглицеридов (TG).

Кроме того, в контексте настоящего изобретения термин "ANGPTL4" включает в себя мутанты природного ангиопоэтинподобного белка 4 (ANGPTL4), которые имеют по существу ту же самую аминокислотную последовательность, что и нативная первичная структура (аминокислотная последовательность), описанная в указанных выше статьях. В данном описании термин "мутанты природного ангиопоэтинподобного белка 4 (ANGPTL4) человека, имеющие по существу такую же аминокислотную последо-

вательность" относится к таким мутантным белкам.

Термин "антитело", используемый в данном описании, означает полноразмерное антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающий участок") или моноцепь. Полноразмерное антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно указывается в данном документе как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно указывается в данном документе как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена: CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, используемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с данным антигеном (например, рецептора окисленных LDL человека (ANGPTL4)). Антигенсвязывающие функции антитела могут выполняться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином антигенсвязывающий участок или антигенсвязывающий фрагмент антитела, включают в себя Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; F(ab)₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела; однодоменное антитело (dAb) (Ward et al., 1989, Nature, 341:544-546), которое состоит из VH- или VL-домена; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR).

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов с помощью искусственного пептидного линкера, который позволяет им экспрессироваться в виде одной белковой цепи, в которой пара VL- и VH-областей образуют моновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv), см., например, Bird et al., 1988, Science, 242:423-426; и Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела включают в себя один или несколько антигенсвязывающих участков или фрагментов антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием традиционных методов, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на пригодность таким же образом, что и интактные антитела.

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть также включены в однодоменные антитела, максиантитела, миниантитела, интраантитела, диантитела, триантитела, тетраантитела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-113). Антигенсвязывающие участки антител могут быть встроены в белковые каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин III типа (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описывается моноантитела на основе фибронектиновых полипептидов).

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть включены в одноцепочечные молекулы, содержащие пару тандемных Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., 1995, Protein Eng., 8(10):1057-1062; и патент США № 5641870).

Используемый в настоящем описании термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в одном антигенном участке. Внутри каждого антигенного участка вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует посредством слабых нековалентных силы с антигеном в многочисленных сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность. Используемый в данном описании термин "высокая аффинность" в отношении антитела или его антигенсвязывающих фрагментов (например, Fab-фрагмента), как правило, относится к антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющим KD 10⁻⁹ M или меньше.

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Природными аминокислотами являются те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицируются, например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. альфа-углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу, и R группу, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфок-

сид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как природные аминокислоты. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно природной аминокислоте.

Термин "специфичность связывания", используемый в данном документе, относится к способности индивидуального антигенсвязывающего участка антитела реагировать только с одной антигенной детерминантой.

Фраза "специфично (или селективно) связывается" с антителом (например, ANGPTL4-связывающее антитело) относится к реакции связывания, которая является решающим фактором в присутствии родственного антигена (например, ANGPTL4 человека или ANGPTL4 яванского макака) в гетерогенной популяции белков и других биомолекул. Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное к антигену" используются в данном документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

Термин "ANGPTL4-опосредованный" относится к тому факту, что ANGPTL4, как известно, ингибирует опосредованный липопротеинлипазой клиренс триглицеридов (TG) и тем самым увеличивает уровень триглицеридов в крови.

"ANGPTL4-ассоциированное расстройство", "ANGPTL4-ассоциированное состояние" или аналогичные термины, используемые в данном документе, относятся к любому ряду состояний или заболеваний, при которых желательны снижение ANGPTL4-опосредованного ингибирования LPL и модуляция содержания липопротеинов. Эти состояния включают, но не ограничиваются ими, те, которые связаны с липидным обменом, такие как гиперлипидемия, гиперлипопротеинемия и дислипидемия, включая атерогенную дислипидемию, диабетическую дислипидемию, гипертриглицеридемию (например, выраженную гипертриглицеридемию (например, с концентрацией триглицеридов в плазме >500 мг/дл), связанную с ожирением гипертриглицеридемию и гипертриглицеридемию V типа), гиперхолестеринемию, хиломикронемия, смешанную дислипидемию (ожирение, метаболический синдром, диабет и т.д.), липодистрофию, липоатрофию и другие состояния, вызванные, например, снижением активности LPL и/или недостаточностью LPL, снижением активности LDL-рецепторов и/или недостаточностью LDL-рецепторов, изменением ApoC2, дефицитом ApoE, повышением ApoB, повышением продукции и/или снижением выведения липопротеинов очень низкой плотности (VLDL), определенной лекарственной терапией (например, дислипидемия, индуцированная лечением глюкокортикоидами), любой генетической предрасположенностью, диетой, образом жизни и т.п.

Другие ANGPTL4-ассоциированные заболевания или расстройства, связанные с или являющиеся результатом гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии и/или дислипидемии, включают в себя, но не ограничиваются ими, сердечно-сосудистые заболевания или нарушения, такие как атеросклероз, аневризма, гипертония, стенокардия, инсульт, цереброваскулярные заболевания, застойная сердечная недостаточность, заболевания коронарных артерий, инфаркт миокарда, заболевания периферических сосудов и т.п.; острый панкреатит; неалкогольный стеатогепатит (NASH); нарушения уровня сахара в крови, такие как диабет; ожирение и т.п.

Термин "химерное антитело" относится к молекуле антитела, в которой

(a) константная область или ее участок изменены, заменены или обменяны таким образом, что антигенсвязывающий участок (вариабельная область) связан с константной областью антитела из другого или измененного класса, с другой или измененной эффекторной функцией и/или из другого или измененного биологического вида либо с совсем другой молекулой, которая придает новые свойства химерному антителу, например ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарственным соединением и т.д.; или

(b) вариабельная область или ее участок изменены, заменены или обменяны на вариабельную область, имеющую другую или измененную антигенную специфичность.

Например, мышинное антитело может быть модифицировано путем замены его константной области константной областью из иммуноглобулина человека. Вследствие замены константной областью иммуноглобулина человека химерное антитело может сохранять свою специфичность в отношении распознавания антигена, одновременно имея сниженную антигенность у человека по сравнению с исходным мышинным антителом.

Термин "консервативно модифицированный вариант" относится к аминокислотным последовательностям и к нуклеотидным последовательностям. В отношении конкретных нуклеотидных последовательностей консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности или где нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность. Из-за вырожденности генетического кода любой данный белок будет кодироваться большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин задается кодоном, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот являются "молчащими вариациями", которые являются одним из видов консервативно

модифицированных вариаций. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем описании, которая кодирует полипептид, также описывает каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с образованием функционально идентичной молекулы. Соответственно каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

В отношении полипептидных последовательностей "консервативно модифицированные варианты" включают в себя отдельные замены, делеции или дополнения в полипептидной последовательности, которые приводят к замене аминокислоты химически аналогичной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, обеспечивающие функционально аналогичные аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг другу:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T); и
- 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин "консервативные модификации последовательности" используется для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают существенного влияния и не искажают характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную специфично связываться с антителом. Эпитопы, как правило, состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров и обычно имеют специфичные трехмерные структурные характеристики, а также специфичные зарядные характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не последним теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

Термин "антитело человека", используемый в данном описании, включает антитела, имеющие вариабельные области, в которых обе каркасная и CDR-области, происходят из последовательностей, принадлежащих человеку. Кроме того, если антитело содержит константную область, она также получена из таких человеческих последовательностей, например последовательностей зародышевой линии человека или мутированных вариантов последовательностей зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенозом *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*).

"Гуманизированное" антитело представляет собой антитело, которое сохраняет антиген-специфическую реактивность антитела животного, например мышиноного моноклонального антитела, в то же время будучи менее иммуногенным при введении в качестве терапевтического средства в организм человека. См., например, Robello et al., Transplantation, 68:1417-1420. Это может быть достигнуто, например, путем сохранения антигенсвязывающих областей иммуноглобулина животного и замены оставшихся частей антитела их аналогами из антитела человека (т.е. константной области, а также участков вариабельной области, не участвующих в связывании). См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1989; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; и Padlan, Molec. Immun., 31:169-217, 1994. Другие примеры технологии гуманизации антител включают, но не ограничены этим технологию Хота, раскрытую в US 5766886.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или нескольких нуклеотидных или полипептидных последовательностей относятся к двум или нескольким последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности имеют определенный процент остатков аминокислот или нуклеотидов, которые одинаковы (т.е. 60% идентичности, необязательно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичности на протяжении определенной области, или, если не указано, на протяжении всей последовательности) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, что измеряется с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального анализа. Необязательно идентичность относится к области, которая имеет в длину по меньшей мере примерно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно к области, которая имеет в длину от 100 до 500 или 1000

или большее число нуклеотидов (или 20, 50, 200 или большее число аминокислот).

При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводятся в компьютер, в случае необходимости указываются координаты субпоследовательностей и указываются параметры программы алгоритма. Можно использовать параметры программы по умолчанию или можно указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности исходя из параметров программы.

"Окно сравнения" в контексте данного документа включает в себя ссылку на сегмент любого одного из числа смежных позиций, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно, от примерно 50 до примерно 200, более типично, от примерно 100 до примерно 150, в которых последовательность можно сравнить с эталонной последовательностью того же числа смежных позиций после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith and Waterman (1970), *Adv. Appl. Math.*, 2:482с, с помощью алгоритма гомологичного выравнивания по Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970, с помощью метода поиска подобия по Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA*, 85:2444, 1988, с помощью компьютерного внедрения этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575, Science Dr., Madison, WI) или путем ручного выравнивания и визуального анализа (см., например, Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)).

Двумя примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает первоначальную идентификацию пар последовательностей с высокими баллами (HSP) путем идентификации коротких отрезков последовательностей ("слов"), имеющих длину W, в анализируемой последовательности, которые совпадают или удовлетворяют некоторому положительному относительно порога баллу T при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T называется пороговым баллом для окрестностей слова (Altschul et al., выше). Эти первоначальные совпадения последовательностей вокруг слова действуют как заправка для начала поиска с целью нахождения более длинных HSP, содержащих их. Совпадения последовательностей вокруг слова удлиняются в обоих направлениях по каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться кумулятивный балл выравнивания. Кумулятивные баллы вычисляются с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров: M (вознаграждение за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей используется матрица подсчета баллов для вычисления кумулятивного балла. Удлинение совпадений по словам в каждом направлении прекращают, когда кумулятивный балл выравнивания падает на величину X от его достигнутого максимального значения; кумулятивный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательным баллом; или при достижении конца любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST - W, T и X - определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует в качестве значения по умолчанию длину слова (W) равную 11, ожидание (E), равное 10, M=5, N=-4, и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует в качестве значения по умолчанию длину слова, составляющую 3, и ожидание (E) 10, а также матрицу подсчета баллов BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:10915, 1989) выравнивание (B) 50, ожидание (E), равное 10, M=5, N=-4, и сравнение обеих нитей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:5873-5787, 1993). Одним из показателей сходства, обеспечиваемым алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P (N)), которая указывает вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет случайным. Например, нуклеиновая кислота считается похожей на эталонную последовательность, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении анализируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой ниже примерно 0,2, более предпочтительно ниже примерно 0,01 и наиболее предпочтительно ниже примерно 0,001.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть также определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы PAM120 веса остатков, штрафа за длину разрыва 12 и штрафа за разрыв 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы PAM120 веса остатков, штрафа за длину разрыва 12 и штрафа за разрыв 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы PAM120 веса остатков, штрафа за длину разрыва 12 и штрафа за разрыв 4.

кислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol., 48:444-453, 1970), который включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на интернет-сайте gcg.com) с использованием матрицы Blossom 62 или матрицы PAM250 и веса разрыва 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, а также веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Кроме процента идентичности последовательностей, указанного выше, другим признаком того, что две нуклеотидные или полипептидные последовательности по существу являются идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с антителами, выработанными против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Еще один признак того, что две нуклеотидные последовательности по существу являются идентичными, состоит в том, что две молекулы или их комплементарные последовательности гибридизуются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже. Еще одним признаком того, что две нуклеотидные последовательности по существу являются идентичными, является то, что для амплификации последовательности могут быть использованы одни и те же праймеры.

Термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу свободно от других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с ANGPTL4, по существу свободно от антител, которые специфично связывают другие антигены, кроме ANGPTL4). Выделенное антитело, которое специфично связывается с ANGPTL4, может тем не менее иметь перекрестную реактивность с другими антигенами. Более того, выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM, IgE, IgG, таким как Ig1 или IgG4), который обусловлен генами константной области тяжелой цепи. Изотип также включает модифицированные версии одного из этих классов, где были произведены модификации, приводящие к изменению функции Fc, например, с целью усиления или уменьшения эффекторных функций или связывания с Fc-рецепторами.

Термин " k_{acc} " или " k_a ", используемый в данном документе, предназначен для обозначения скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин " $k_{дисс}$ " или " k_d ", используемый в данном документе, предназначен для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин " K_D ", используемый в данном документе, предназначен для обозначения константы диссоциации, которая получается из отношения k_d к k_a (т.е. k_d/k_a) и выражается в виде молярной концентрации (M). Значения K_D для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в данной области.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" в контексте настоящего документа относятся к препарату молекул антител одной молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела отражает единственную специфичность связывания и аффинность в отношении определенного эпитопа.

Термин "нуклеиновая кислота" используется в данном документе взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные каркасные остатки или связи, которые являются синтетическими, природными и неприродными, которые имеют сходные связывающие свойства с эталонной нуклеиновой кислотой и которые метаболизируются аналогичным образом с эталонными нуклеотидами. Примеры таких аналогов включают без ограничения фосфоротиоаты, фосфоамидааты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метил-рибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA).

Если не указано иное, то конкретная нуклеотидная последовательность также неявно включает свои консервативно модифицированные варианты (например, вырожденные замены кодонов) и комплементарные последовательности, а также последовательности, указанные в явном виде. В частности, как подробно описано ниже, вырожденные замены кодонов могут быть получены путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено смесью любых и/или дезоксиинозиновых остатков (Batzner et al., Nucleic. Acid. Res., 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98, 1994).

Термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между двумя или несколькими полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Как правило, этот термин относится к функциональной взаимосвязи транскрипционной регуляторной последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в подходящей клетке-хозяине или другой экспрессионной системе. В общем промоторные последовательности, регулирующие транскрипцию, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к транскрибируемой последовательности, т.е. они являются цис-действующими. Однако некоторые транскрипционные регуляторные после-

довательности, такие как энхансеры, необязательно должны физически примыкать или располагаться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, чью транскрипцию они усиливают.

Используемый в данном документе термин "оптимизированный" означает, что нуклеотидная последовательность была изменена, чтобы кодировать аминокислотную последовательность с использованием кодонов, которые являются предпочтительными в продуцирующей клетке или организме, как правило, эукариотической клетке, например клетке *Pichia*, клетке яичника китайского хомячка (СНО) или клетках человека. Оптимизированная нуклеотидная последовательность генно-инженерно модифицирована так, чтобы полностью или в максимально возможной степени сохранять аминокислотную последовательность, первоначально кодируемую исходной нуклеотидной последовательностью, которая также известна как "родительская" последовательность.

Оптимизированные последовательности в данном изобретении были модифицированы таким образом, чтобы они содержали кодоны, которые предпочтительны в клетках млекопитающих. Однако в данном документе также предусмотрена оптимизированная экспрессия этих последовательностей в других эукариотических или прокариотических клетках. Аминокислотные последовательности, кодируемые оптимизированными нуклеотидными последовательностями, также называются оптимизированными.

Термины "полипептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоте, а также природные аминокислотные полимеры и неприродные аминокислотные полимеры. Если не указано иное, то конкретная полипептидная последовательность также неявно включает свои консервативно модифицированные варианты.

Термин "рекомбинантное антитело человека", используемый в данном документе, включает в себя все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулинов человека, или гибридомы полученные из них, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела человека, например, из трансфектомы, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые включают сплайсинг всех или участка последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими ДНК-последовательностями. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные области, в которых каркасные и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления тем не менее такие рекомбинантные человеческие антитела могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* (или когда используется животное является трансгенным по Ig-последовательностям человека - соматическому мутагенезу *in vivo*) и поэтому аминокислотные последовательности из VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые могут не присутствовать в репертуаре антител зародышевой линии человека, в то время как они получены из и связаны с VH- и VL-последовательностями из зародышевой линии человека.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки человека или животного, но и потомства такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях вследствие мутаций или воздействия окружающей среды, такое потомство может в действительности быть неидентичным родительской клетке, но по-прежнему включено в объем термина "клетка-хозяин", используемого в данном документе.

Термин "субъект" включает человека и животных. Животные включают всех позвоночных (например, млекопитающих и других животных), таких как приматы (например, яванский макак), овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. За исключением отдельно указанных случаев термины "пациент" или "субъект" используются в данном документе взаимозаменяемо. Используемые в данном описании термины "яванский макак" или "макак-крабоед" относятся к яванскому макаку (*Macaca fascicularis*).

Используемые в данном документе термины "лечение" или "терапия" в отношении любого заболевания или расстройства (например, ANGPL4-ассоциированного расстройства) относятся в одном варианте осуществления к ослаблению заболевания или расстройства (т.е. к замедлению, прекращению или ослаблению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечение" или "терапия" относятся к уменьшению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые пациент не может определить. В еще одном варианте осуществления "лечение" или "терапия" относятся к физической (например, к стабилизации заметного симптома), физиологической (например, к стабилизации физического параметра) или к обоим вариантам модуляции заболевания или расстройства. В еще одном варианте осуществления "лечение" или "терапия" относятся к предупреждению или задержке начала развития или прогресса заболевания или расстройства.

"Предупреждение" в отношении показаний, описанных в данном документе, включая, например,

ANGPTL4-ассоциированные расстройства, означает любое действие, которое предупреждает или замедляет ухудшение, например, ассоциированных с ANGPTL4 параметров заболеваний, описанных ниже, у пациента, имеющего повышенный риск в отношении указанного ухудшения.

Термин "вектор" предназначен для описания полинуклеотидной молекулы, способной транспортировать другой полинуклеотид, с которым она связана. Один тип векторов представляет собой "плазмиду", которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип векторов представляет собой вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный вектор (AAV или AAV2), в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы указываются в данном документе как "рекомбинантные экспрессионные векторы" (или просто "экспрессионные векторы"). В общем экспрессионные векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании термины "плазида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако настоящее изобретение предусматривает включение других форм экспрессионных векторов, таких как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1D изображено блокирование ANGPTL4-опосредованного ингибирования белка липопротеинлипазы (LPL) человека с помощью отобранных анти-ANGPTL4 антител по изобретению.

На фиг. 2 показано связывание отобранных антител по изобретению с полноразмерным ANGPTL4 человека и N-концевым биспиральным доменом ANGPTL4 человека, а также отсутствие связывания с полноразмерным ANGPTL3 человека. ANGPTL3 Ab=ANGPTL3-специфичное эталонное антитело.

На фиг. 3A, 3B изображено изменение уровня триглицеридов в плазме у мышей, трансгенных по ANGPTL4 человека, после введения отобранных анти-ANGPTL4 антител по изобретению.

На фиг. 4 показаны общие концентрации человеческих антител в плазме у имеющих избыточный вес и сахарный диабет яванских макаков после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению (NEG276-LALA).

На фиг. 5 показаны изменения концентрации триглицеридов (TG) в плазме у имеющих избыточный вес и сахарный диабет яванских макаков после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению (NEG276-LALA).

На фиг. 6 представлены изменения концентрации общего холестерина в плазме у имеющих избыточный вес и сахарный диабет яванских макаков после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению (NEG276-LALA).

На фиг. 7 приведены изменения концентрации липопротеинов высокой плотности (HDL) в плазме у имеющих избыточный вес и сахарный диабет яванских макаков после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению (NEG276-LALA).

На фиг. 8 приведены изменения концентрации общего аполипопротеина В (ApoB) в плазме у имеющих избыточный вес и сахарный диабет яванских макаков после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению (NEG276-LALA).

На фиг. 9 приведены изменения концентрации аполипопротеина С-III (ApoC-III) в плазме у имеющих избыточный вес и сахарный диабет яванских макаков после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению (NEG276-LALA).

На фиг. 10 приведены изменения уровня липопротеин-ассоциированного холестерина в плазме, оцениваемые с помощью разделения плазматических липопротеинов с использованием быстрой белковой жидкостной хроматографии (FPLC), после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению. Показаны данные для одной обезьяны (NEG276-LALA, обезьяна № 6296). Сокращения: TRL, богатые триглицеридами липопротеины; LDL, липопротеины низкой плотности; HDL, липопротеины высокой плотности.

На фиг. 11 приведены изменения уровней липопротеин-ассоциированных триглицеридов (TG) в плазме, оцениваемые с помощью разделения плазматических липопротеинов с использованием быстрой белковой жидкостной хроматографии (FPLC), после введения одного анти-ANGPTL4 антитела по изобретению. Показаны данные для одной обезьяны (NEG276-LALA, обезьяна № 6296). Сокращения: TRL, богатые триглицеридами липопротеины; LDL, липопротеины низкой плотности; HDL, липопротеины высокой плотности.

Подробное описание

Настоящее изобретение основано частично на обнаружении молекул антител, которые специфично связываются с ANGPTL4 и ингибируют его биологическую активность. Изобретение относится к обоим

полноразмерным IgG-антителам (например, гуманизированным антителам NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319), а также их антигенсвязывающим фрагментам, таким как Fab-фрагменты.

Соответственно настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека), фармацевтическим композициям, способам получения и к способам применения таких антител и композиций.

Белки ANGPTL4.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с ANGPTL4 и ингибируют его биологическую активность, включая способность активировать липопротеинлипазу (LPL).

Напротив, ангиопоэтинподобный белок 4 (ANGPTL4) является членом ангиопоэтинового семейства секретлируемых белков. Он представляет собой гомоолигомерный белок, способный образовывать димеры и тетрамеры, экспрессируемый различными типами клеток, включающими макрофаги, клетки жировой ткани, мышц и печени. ANGPTL4 также известен как печеночный фибриноген/ангиопоэтинродственный белок (HFARP) (Kim et al. (2000), (2000) *Biochem. J.*, 346:603-610); PPAR-гамма ангиопоэтинродственный белок (PGAR) (Yoon, et al. (2000), *Mol. Cell Biol.*, 20:5343-5349); и индуцированный голоданием фактор жировой ткани (FIAF) (Kerten et al. (2000), *J. Biol. Chem.*, 275:28488-28493). ANGPTL4 содержит N-концевой биспиральный домен и C-концевой фибриноген(FBN)-подобный домен (Kim et al. (2000), *Biochem. J.*, 346:603-610).

Липопротеинлипаза (LPL) играет центральную роль в метаболизме липопротеинов, поддерживая уровни липопротеинов в крови через тканеспецифичную регуляцию их активности, определяющей когда и в каких тканях высвобождаются триглицериды (TG). Биспиральная область в ANGPTL4, как известно, ингибирует LPL-опосредуемый клиренс триглицеридов. Поэтому для всех мутаций ANGPTL4 с потерей функций (например, как показано на человеке), генетических делеций (например, как показано на трансгенных мышцах) и ингибирующих антител (например, как показано на мышцах и яванских макаках) наблюдается снижение уровня триглицеридов в плазме крови. Кроме того, также известно, что анти-ANGPTL4 антитела активируют LPL. Напротив, инъекционное введение ANGPTL4 в организм мышей приводит к быстрому увеличению триглицеридов в кровотоке и это происходит с более высокой скоростью, чем при инъекционном введении ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3) (Yoshida et al. (2002), *J. Lipid Res.*, 43:1770-1772).

Анти-ANGPTL4-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, инициируют, способствуют или усиливают активацию LPL, например, путем блокирования ANGPTL4-ингибирования LPL, тем самым снижая уровень триглицеридов в плазме крови. Эти антитела, как ожидается, будут предупреждать и смягчать острые и хронические проявления заболеваний, характеризующихся повышенным уровнем триглицеридов, например первичной дислипидемии, гипертриглицеридемии, метаболического синдрома, диабета второго типа и т.п.

Анти-ANGPTL4-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, инициируют, способствуют или усиливают активацию LPL, например, путем блокирования ANGPTL4-ингибирования LPL, тем самым снижая уровень триглицеридов в плазме крови. Эти антитела, как ожидается, будут предупреждать и смягчать острые и хронические проявления заболеваний, характеризующихся повышенным уровнем триглицеридов, например первичной дислипидемии, гипертриглицеридемии, метаболического синдрома, диабета второго типа и т.п.

Анти-ANGPTL4-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с ANGPTL4. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с ANGPTL4 человека и яванского макака. Антитела по изобретению включают, но не ограничиваются ими, гуманизированные антитела и Fab, выделенные, как описано в примерах.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека и яванского макака), где антитела содержат VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4, где антитела содержат CDR VH-домена (VH CDR), имеющую аминокислотную последовательность любой одной из VH CDR, перечисленных в табл. 1 ниже. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека и яванского макака), где антитела включают (или альтернативно состоят из) одной, двух, трех или нескольких VH CDR, имеющих аминокислотную последовательность, любой из VH CDR, перечисленных в табл. 1 ниже.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4, причем указанные антитела, включают VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека и яванского макака), причем указанные антитела содержат CDR VL-домена (VL CDR), имеющую аминокислотную последовательность любой одной из VL CDR, перечисленных в табл. 2 ниже. В частности, настоящее

изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека и яванского макака), причем указанные антитела включают (или в качестве альтернативы, состоят из) одной, двух, трех или нескольких VL CDR, имеющих аминокислотную последовательность любой из VL CDR, перечисленных в табл. 1 ниже.

Другие антитела по изобретению включают аминокислоты, которые были мутированы, но имеют по меньшей мере 60, 70, 80, 85, 90 или 95% идентичности в областях CDR с областями CDR, приведенными в последовательностях, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления они включают в себя мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в областях CDR по сравнению с областями CDR, приведенными в последовательностях, описанных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, которые кодируют VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, которые специфично связываются с белком ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека и яванского макака). Такие нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих (например, в табл. 1 показаны оптимизированные нуклеотидные последовательности для тяжелых цепей и легких цепей антител по изобретению).

Таблица 1

Примеры анти-ANGPTL4-антител, Fab-фрагментов и белков ANGPTL4

Описание последовательности	Идентификатор последовательности (SEQ ID NO)	Аминокислотная или полинуклеотидная последовательность
Аминокислотная последовательность ANGPTL4 человека (ссылка на последовательность в NCBI: NM_139314.2)	1	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTGEGSTDLPLAPESRVDFEVLSLQTLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQFVDPANVNSRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFETIQPQGSPPFLVNCMTSDGGWTVIQRHDGSDVDFNRPWEAYKAGFGDPHGFLEKLVHSITGDRNSRLAVQLRWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHLRDRKCAKSLSGGWVFGTCSHNLNGQYFRSIPQQRQKLLKGI FWKTWRGRYYLPQATTMLIQPMAAEAAAS
Нуклеотидная последовательность ANGPTL4 человека (ссылка в NCBI: NM_139314.2)	2	ATGAGCGGTGCTCCGACGGCCGGGCGAGCCCTGATGCTCTGCCGCGCCACCGCGTGTACTGAGCGCTCAGGGCGGACCCGTGCATCCAAGTCGCCCGCCTTTCGCTCCTGGGACGAGATGAATGTCCCTGCAGCAGGACTCCTGCAGCTCAGGCGAGGGCTGCCGCAACACCGGAGCGCACCCGAGTCAGCTGAGCGCGCTGGAGCGGCCTGAGCGCGTGCAGGTAACCGGCTGCAGGAAACCGAGGGTCCACCGACCTCCCGTGTAGCCCCGTGAGAGCGGGTGGACCCTGAGGTCCCTCACAGCCTGCAGACACAACCTCAAGGCTCAGAACAGCAGGATCCAGCAACTCTCCACAAGGTGGCCAGCAGCAGCGGCACCTGGAGAAGCAGCACCTGGCAATTCAGCATCTGCAAAGCCAGTTTGGCCTCCTGGACCACAAGCACCTAGACCATGAGGTGGCCAAGCCTGCCCGAAAGAAAGAGGCTGCCCGAGATGGCCAGCCAGTTGACCCGGCTCACAAATGTACAGCCGCTGCACCGGCTGCCAGGGATGCCAGGAGCTGTCCAGGTGGGGAGAGGAGAGTGGACTATTTGAAATCCAGCCTCAGGGTCTCCGCCATTTTGGTGAAGTGAAGATGACCTCAGATGGAGGCTGGACAGTAATTCAGAGGCCACCGATGGCTCAGTGGACTCAACCGCCCTGGGAAGCCTACAAGCGGGGTTGGGATCCCCACGGCGAGTCTGGCTGGTCTGGAGAAGGTGCATAGCATCACGGGGACCGCAACAGCCGCTGGCCGTGCAGCTGCGGGASTGGGATGGCAACCGGAGTTGCTGCAGTCTCCGTGCACCTGGGTGGCAGGACCGCTATAGCCTGCAGCTCACTGCACCCGTGGCCGCGCAGCTGGGCGCCACCCCGTCCACCCAGCGGCTCTCGTACCCTTCTCCATTGGGACAGGATCACGACCTCCGACGGACAAGAACTGCGCCAGAGCCTCTTGGAGGCTGGTGGTTTGGCACCTGCAGCCATTCAACCTCAACGGCCAGTACTTCCGCTCCATCCACAGCAGCGGAGAAAGCTTAAGAAGGGAATCTTGGGAAGACCTGGCGGGCGCTACTACCCGCTGCAGGCCACCACCATGTTGATCCAGCCCATGGCAGCAGAGGCCAGCCTCCTAGCGTC
ANGPTL4 яванского макака (аминокислотная последовательность)	3	MARGAPTAGAALMLCVATAVLLRAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLNALERRLSACGSACQGTGEGSTDLPLAPESRVDFEVLSLQTLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQRLQSQVGLLDPKHLHDHEVAKPARRKRRPEMAQFVDSAHNASRLHRLPRDCQELFEDGERQSGLFETIQPQGSPPFLVNCMTSDGGWTVIQRHDGSDVDFNRPWEAYKAGFGDPQGEFVLEKLVHS

ость)		ITGDRNSRLAVQLQDWDGNAESLQFSVHLGGEDTAYSLLQLEPV ASQLGATTVPFSGLSVFFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWVFG TCSHNSNLNGYFRSIPQQRQELKKGIFWKTWRGRYYPLQATMML IQPTAAEAAS
ANGPTL4 яванского макака (нуклеотидная последовательн ость)	4	ATGCGCGGTGCTCCGACGGCCGGAGCAGCCCTGATGCTCTGCGT CGCCACGGCCGTGCTGCTGAGAGCTCAGGGCGGCCCGGTGCAGT CCAAGTCTCCGCGCTTTGCGTCTGGGACGAGATGAATGTCCTG GCGCACGGACTCCTGCAGCTAGGCCAGGGGCTGCGCGAACACGC GGAGCGCACCCGAGTCACTGAACGCGCTGGAGCGGCGCCTCA GCGCTTGGCGGTCTGCTGCCAGGGAACCGAGGGGTCCACCGCC CTCCCGTTAGCCCTGAGAGCCGGGTGGACCCTGAGGTCTTCA CAGCCTGCAGACACAACCTCAAGGCTCAGAACAGCAGGATCCAGC AACTCTTCCACAAGGTGGCCAGCAGCAGCGGCACCTGGAGAAG CAGCACCTGCGAATTCAGCGTCTGCAAAGCCAGGTTGGCCTCCT GGACCCCAAGCACCTAGACCATGAGGTGGCCAAGCCTGCCGAA GAAAGAGGCGGCCGAGATGGCCAGCCAGTTGACTCGGCTCAC AATGCCAGCGCCTGCACCGGCTGCCAGGGATTGCCAGGAGCT GTTTGAAGATGGGGAGAGGCAGAGTGGACTATTTGAGATCCAGC CTCAGGGGTCTCCGCATTTTGGTGAAGTCAAGATGACCTCA GATGGAGGCTGGACAGTAATTCAGAGGCCACCATGAGTCTGT GGACTTCAACCGCCCTGGGAAGCCTACAAGCGGGGTTTGGGG ATCCCAAGCGAGTCTGGCTGGCCCTGGAGAAGGTGCATAGC ATCACAGGGGACCGCAACAGCCGCTGGCCGTCAGCTGCAGGA CTGGGATGGCAACCGCGAGTCGCTGCAGTCTCTGTGCACCTGG GTGGCGAGGACACGGCTTACAGCCTGCAGCTCACCGAGCCGTG GCCAGCCAGTTGGGTGCCACCACCTCCCGCCTAGCGGCTCTC CGTACCCTTCTCACTTGGGACCAGGATCACGACCTCCGCAGGG ACAAGAAGTGCAGCAAGAGCCTCTTGGAGGCTGGTGGTTGGC ACCTGCAGCCATTCCAACCTCAATGGCCAGTACTTCCGCTCCAT CCCACAGCAGCGGCAGGAGCTTAAGAAAGGAATCTTCTGGAAGA CCTGGCGGGCCGCTACTACCCGCTGCAGGCCACCACCATGTTG ATCCAGCCCACGGCGGCAGAGGCAGCCTCCTAG
Аминокислотная последовательн ость ANGPTL3 человека (ссылка на последовательн ость в NCBI: NM_014495.3)	5	MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSEPKSRFAMLDVVK ILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQ TSEIKEEELRRTTYKLVKNEEVKNMSLELNSKLESLEEKI LLQQVKVYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSCLKTFVEKQDNSIK DLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKP RAPRTPPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVIVSGSPWTLIQHRIDGSONFNETWENYKYGFGR LDGEFWLGLEKIYSLVKQSNYVLRLELEDWKNKHYIEYSFYLG NHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKKAGHFNCPE GYSGGWWWHDCEGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSONGR LYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
Нуклеотидная последовательн ость ANGPTL4 человека (ссылка на последовательн ость в NCBI: NM_014495.3)	6	ATGTTCAACAATTAAGCTCCTTCTTTTATGTTCTCTAGTTAT TTCTCCAGAATTGATCAAGACAATTCATCATTGATTCTCTAT CTCCAGAGCCAAAATCAAGATTTGCTATGTTAGACGATGTA ATTTTAGCCAATGGCCTCCTTCAAGTGGGACATGGTCTTAAAGA CTTTGTCCATAAGACGAGGGCCAAATTAATGACATATTTCAA AACTCAACATATTTGATCAGTCTTTTATGATCTATCGTGCAA ACCAGTGAATCAAAGAAGAAAAGGAACTGAGAAGAACTAC ATATAAAGTCAAGTCAAAAATGAAGAGGTAAGAATATGTCAC TTGAACTCAACTCAAACTTGAAGCCTCCTAGAAGAAAAAAT CTACTTCAACAAAAGTGAATATTTAGAGAGCAACTAACTAA CTTAATCAAAAATCAACCTGAACTCCAGAACCCAGAAAGTAA CTTCACTTAAACTTTGTAGAAAAACAAGATAATAGCATCAA GACCTTCTCCAGACCGTGGAGACCAATATAACAATTAACCA ACAGCATAGTCAAATAAAGAAATAGAAAATCAGCTCAGAAGGA CTAGTATTAAGAAGCCACAGAAATTTCTCTATCTTCCAGCCA AGAGCACCAAGAAGTACTCCCTTCTTCAAGTGAATGAATAAG

		AAATGTA AACATGATGGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTT ATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCC AGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGG TAGTCCATGGACATTAATCAACATCGAATAGATGGATCACAAA ACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGG CTTGATGGAGAATTTGGTTGGCCTAGAGAAGATATACTCCAT AGTGAAGCAATCTAATTAATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACT GGAAGACAACAACATTATATTGAATATCTTTTTACTTGGGA AATCACGAAACCACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGG CAATGTCCCAATGCAATCCCGAAAACAAAGATTTGGTGTTTT CTACTTGGGATCACAAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAG GGTTATTTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAA CAACCTAAATGGTAAATATAACAACCAAGAGCAAAATCTAAGC CAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAACTCTCAAAATGGAAGG TTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGA TTCAGAAAGCTTTGAA
NEG276		
HCDR1 (по Кабату)	7	SSWMQ
HCDR2 (по Кабату)	8	EIDPSDNYANYNQKFQG
HCDR3 (по Кабату)	9	GSYFSNFFDY
HCDR1 (по Чотия)	10	AYTFTSS
HCDR2 (по Чотия)	11	DPSDNY
HCDR3 (по Чотия)	12	GSYFSNFFDY
VH	13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASAYTFTSSWMQWVRQAPGG LEWMGEIDPSDNYANYNQKFQGRVTLTVDSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCASGSYFSNFFDYWGQGLTVTVSS
ДНК, кодирующая VH	14	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGCTACACCTTTA CCAGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGACAGGGC CTGGAATGGATGGGCGAGATCGACCCAGCGACAACCTACGCCAA CTACAACCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGC GAGGACACCGCGTGTACTATTGTGCCAGCGGCAGCTACTTCAG CAACTTCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGT CATCT
Тяжелая цепь	15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASAYTFTSSWMQWVRQAPGG LEWMGEIDPSDNYANYNQKFQGRVTLTVDSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCASGSYFSNFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVFEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNNHTQ KSLSLSPGK

ДНК, кодирующая тяжелую цепь	16	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTTGCAGAGCCAGCGCCTACACCTTTA CCAGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCCAGGCTCCTGGACAGGGC CTGGATGGATGGGGGAGATCGACCCAGCGACAACACTACGCCAA CTACAACCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCGTACCCGTGGACA CCAGCACCTCCACCCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGGAGC GAGGACACCGCCGTGTAATAATTGTGCCAGCGGCAGCTACTTCAG CAACTTCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGT CATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCC AGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCTGGGTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGGTGCACACCTTCCCCGCGTGTG CAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGAGGCCAAG AGCTGCGACAAGACCACACCTGCCCCCTGCCAGCCCCAGA GCTGCTGGGGGACCCTCCGTGTTCTGTCCCCCAAGCCCA AGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGTG ACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCTCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACC CCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGTGACAGGCCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
LCDR1 (по Кабату)	17	KASQDIGSNLN
LCDR2 (по Кабату)	18	AVSNRGP
LCDR3 (по Кабату)	19	LQYASSPWT
LCDR1 (по Чотия)	20	SQDIGSN
LCDR2 (по Чотия)	21	AVS
LCDR3 (по Чотия)	32	YASSPW
VL	23	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNLNLWQKPGQAP RRLIYAVSNRGPPIPARFSGSRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYC LQYASSPWTFGQGTKVEIK
ДНК, кодирующая VL	24	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCCGCCACCCTGTCCGTGTCTCC AGGGCAAAGAGCCACCCTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCG GCAGCAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAACCAGGCCAGGCCCCC AGAAGGCTGATCTACGCTGTTTCCAACCGTGGTCTGGCATCCC CGCCAGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAGTACACCCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC CTGCAGTACGCCAGCAGCCCTGGACATTTGGCCAGGGCACCAA GGTGGAAATCAAG

Легкая цепь	25	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNLNLWQQKFGQAP RRLIYAVSNRGPPIPARFSGSRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYC LQYASSPWFPGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	26	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCCGCCACCCTGTCCGTGTCTCC AGGGCGAAAGAGCCACCCTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCG GCAGCAACCTGAACCTGGCTGCAGCAGAAACCAGCCAGGCCCC AGAAGGCTGATCTACGCTGTTTCCAACCGTGGTCTGGCATCCC CGCCAGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAGTACACCCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGAGCGAGGACTTCGCCGTGTAAGTGC CTGCAGTACGCCAGCAGCCCTGGACATTTGGCCAGGGCACCAA GGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCT TCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCAGCCAGCGTG GTGTGCTGCTGAACAACCTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGA GCGTACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
NEG276-LALA		
HCDR1 (по Кабату)	7	SSWMQ
HCDR2 (по Кабату)	8	EIDPSDNYANYNQKFGQ
HCDR3 (по Кабату)	9	GSYFSNFFDY
HCDR1 (по Чотия)	10	AYTFTSS
HCDR2 (по Чотия)	11	DPSDNY
HCDR3 (по Чотия)	12	GSYFSNFFDY
VH	13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTSSWMQWVRQAPGQG LEWMGEIDPSDNYANYNQKFGQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCASGSYFSNFFDYWGQGLVTVSS
ДНК, кодирующая VH	27	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAGTGAAGAAACCCGG CGCTAGTGTGAAAGTCAGCTGTAAGCTAGTGCCTACACCTTCA CCTCTAGCTGGATGCAGTGGGTGACACAGGCCCCAGGTCAGGGC CTGGAGTGGATGGGCGAGATCGACCCTAGCGATAACTACGCTAA CTATAATCAGAAGTTTCAGGGTAGAGTCACCCTGACCGTGGACA CTAGCACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCA GAGGACACCGCCGCTACTACTGCGCTAGTGGTAGCTACTTCTC TAACTTCTTCGACTACTGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGT CTAGC
Тяжелая цепь	28	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTSSWMQWVRQAPGQG LEWMGEIDPSDNYANYNQKFGQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCASGSYFSNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY

		LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PFVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ДНК, кодирующая тяжелую цепь	29	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCAAGTGAAGAAACCCGG CGCTAGTGTGAAAGTCAGCTGTAAGCTAGTGCCTACACCTTCA CCTCTAGCTGGATGCAGTGGGTGACACAGGCCCCAGGTCAGGGC CTGGAGTGGATGGCGGAGATCGACCCTAGCGATAAАCTACGCTAA CTATAATCAGAAGTTTCAGGGTAGAGTCACCCTGACCGTGGACA CTAGCACTAGCACCCCTATATGGAАCTGTCTAGCCTGAGATCA GAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGTGGTAGCTACTTCTC TAACTTCTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGT CTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCT TCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAACT CTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTG CAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACAGTGCC TTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAG TCCTGCGACAAGACCACACCTGTCTTCCCTGCCCTGCTCCTGA AGCTGCTGGCGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAGCCCA AGGACACCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACAGGATCCTGAAGTGAAGTCAATTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTC GGGAGGAACAGTACAАCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTCTG ACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAAAGACAA TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACC CTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGG AGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAАCTACAAGACCACC CCTCCTGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCAA ACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT CCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGTCTCCGGCAAG
LCDR1 (по Кабату)	17	KASQDIGSNLN
LCDR2 (по Кабату)	18	AVSNRGP
LCDR3 (по Кабату)	19	LQYASSPWT
LCDR1 (по Чотия)	20	SQDIGSN
LCDR2 (по Чотия)	21	AVS
LCDR3 (по Чотия)	22	YASSPW
VL	23	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNLNWLQQKPGQAP RRLIYAVSNRGPPIPARFSGSRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYC LQYASSPWTFGQGTKVEIK
ДНК, кодирующая VL	30	GAGATCGTGTGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCGTCAGCCC TGGCGAGCGGGCTACACTGAGCTGTAAGCCTCTCAGGATATCG GCTCTAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCT AGACGGCTGATCTACCCGTGTCTAATAGAGGCCCCGGAAATCCC CGCTAGGTTTAGCGGCTCTAGGTCAGGTTCAAGTACACCCCTGA

		CTATCTCTAGCCTGCAGTCAGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGC CTGCAGTACGCCTCTAGCCCCTGGACCTTCGGTCAGGGCACTAA GGTCGAGATTAAG
Легкая цепь	25	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNLNLQQLKPGQAP RRLIYAVSNRGPPIPARFSGSRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYC LQYASSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLS STLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	31	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCCTGAGCGTCAGCCC TGGCGAGCGGGCTACACTGAGCTGTAAGCCTCTCAGGATATCG GCTCTAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCT AGACGGCTGATCTACGCCGTGTCTAATAGAGGCCCGGAATCCC CGCTAGGTTTAGCGGCTCTAGGTCAGGTTTACAGGTACACCCTGA CTATCTCTAGCCTGCAGTCAGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGC CTGCAGTACGCCTCTAGCCCCTGGACCTTCGGTCAGGGCACTAA GGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCT TCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGGGCACCAGCGAGCGTG GTGTGCTGTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGA GCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCTGCGAGGTGACCCAGGGCCGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
NEG278		
HCDR1 (по Кабату)	32	SSWMQ
HCDR2 (по Кабату)	33	EIDPSDNYANYNQKFQG
HCDR3 (по Кабату)	34	GSYFSNFFDY
HCDR1 (по Чотия)	35	AYTFTSS
HCDR2 (по Чотия)	36	DPSDNY
HCDR3 (по Чотия)	37	GSYFSNFFDY
VH	38	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASAYTFTSSWMQWVRQAPGQG LEWMGEIDPSDNYANYNQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCASGSYFSNFFDYWGQGLVTVSS
ДНК, кодирующая VH	39	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGCCTACACCTTTA CCAGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGACAGGGC CTGGAATGGATGGGCGAGATCGACCCAGCGACAACACTACGCCAA CTACAACCAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGC GAGGACACCGCGTGTACTATTGTGCCAGCGGCAGCTACTTCAG CAACTTCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGT CATCT
Тяжелая цепь	40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASAYTFTSSWMQWVRQAPGQG LEWMGEIDPSDNYANYNQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCASGSYFSNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL

		QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYF LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNHYTQ KSLSLSPGK
ДНК, кодирующая тяжелую цепь	41	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTTCAAGGCCAGCGCCTACACCTTTA CCAGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGACAGGGC CTGGAATGGATGGGCGAGATCGACCCAGCGACAACACTACGCCAA CTACAACCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGC GAGGACACCGCCGTGACTATTGTGCCAGCGGCAGTACTTTCAG CAACTTCTTCTGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTGT CATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCC AGCAGCAAGAGCACAGCGCGGCAGCAGCCGCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCAGCCCAAG GCTGTGGGCGGACCTCCGTGTCTTCCCTGTTCCCTCCCAAGCCCA AGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG CAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTACCCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCAC CCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG GCTGACGCGTGTGACAGGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCGGCAAG
LCDR1 (по Кабату)	42	KASQDIGSNLN
LCDR2 (по Кабату)	43	AASVREP
LCDR3 (по Кабату)	44	LQYASSPWT
LCDR1 (по Чотия)	45	SQDIGSN
LCDR2 (по Чотия)	46	AAS
LCDR3 (по Чотия)	47	YASSPW
VL	48	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNLNLWQKPGQAP RRLIYAASVREPGIPARFSGSRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYC LQYASSPWTFGQGTKVEIK
ДНК,	49	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCCGCCACCCTGTCCGTGTCTCC

кодирующая VL		AGGCGAAAGAGCCACCCTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCG GCAGCAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAACCAGGCCAGGCCCCC AGAAGGCTGATCTACGCTGCTTCCGTCCGTGAGCCTGGCATCCC CGCCAGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAGTACACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC CTGCAGTACGCCAGCAGCCCCTGGACATTTGGCCAGGGCACCAA GGTGGAAATCAAG
Легкая цепь	50	EIVMTQSPATLSVSPGERATLISKASQDIGSNLNLWLQKPGQAP RRLIYAASVREPGIPARFSGSRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYC LQYASSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	51	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCGCCACCCTGTCCTGTCTCC AGGCGAAAGAGCCACCCTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCG GCAGCAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAACCAGGCCAGGCCCCC AGAAGGCTGATCTACGCTGCTTCCGTCCGTGAGCCTGGCATCCC CGCCAGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAGTACACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC CTGCAGTACGCCAGCAGCCCCTGGACATTTGGCCAGGGCACCAA GGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCACAGCGTGTTCATCT TCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGA GCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGCGAGTGC
NEG310		
HCDR1 (по Кабату)	52	SYTMH
HCDR2 (по Кабату)	53	YINPSSGYTKYNQKFQG
HCDR3 (по Кабату)	54	GWLLLAMDY
HCDR1 (по Чотия)	55	GYTFTSY
HCDR2 (по Чотия)	56	NPSSGY
HCDR3 (по Чотия)	57	GWLLLAMDY
VH	58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSGYTKYNQKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAEGWLLLAMDYWGQGLVTVSS
ДНК, кодирующая VH	59	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGCTACACCTTFA CCAGCTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGA CTGGAATGGATGGGCTACATCAACCCAGCAGCGGCTATACCAA GTACAACCAGAAATTCAGGGCCGCGTGACCATGACCGCCGACA AGAGCACAAAGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGC GAGGACACCGCCGTGACTATTGTGCCGAGGGCTGGCTGCTGCT GGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTA GT

Тяжелая цепь	60	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSGYTKYNQKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAEGWLLAMDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFFLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP FVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
ДНК, кодирующая тяжелую цепь	61	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTTA CCAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGA CTGGAAATGGATGGGCTACATCAACCCAGCAGCGGCTATACCAA GTACAACCAGAAATCCAGGGCCGCGTGACCATGACCGCCGACA AGAGCACAAGCACCCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGC GAGGACACCGCCGTACTATTGTGCCGAGGGCTGGCTGCTGCT GGCCATGGATATTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTGTCTA GTGCTAGCACCAAGGGCCAGCGGTGTCCCCCTGGCCCCAGC AGCAAGAGCACCCAGCGGGCCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCG GAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGCCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA AGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCTTCCCCCAAGCCCAAG ACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTG CCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC CTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCC CCAGTGTGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCT GACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGT GCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
LCDR1 (по Кабату)	62	RSSTGAVTTSNYAI
LCDR2 (по Кабату)	63	GTNNRAP
LCDR3 (по Кабату)	64	ALWYSDHWV
LCDR1 (по Чотия)	65	STGAVTTSNY
LCDR2 (по Чотия)	66	GTN
LCDR3 (по Чотия)	67	WYSDHW

VL	68	EAVVTQSPATLSLSPGERATLSCRSTGAVTTSNYAIWVQEKPG QAPRGLIGGTNNRAPGIPARFSGSLSGDDATLTISSLQPEDFAV YFCALWYSDHWVFGQGTKVEIK
ДНК, кодирующая VL	69	GAAGCCGTCGTGACACAGAGCCCTGCCACCCTGTCAGTCTGAGCCC TGGCGAAAGAGCCACCCTGAGCTGCAGATCTAGCACCGGCGCTG TGACCACCAGCAACTACGCCATCTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGC CAGGCTCCCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAATAGAGCCCC TGGCATCCCCGCCAGATTACAGCGATCTCTGTCTGGCGACGACG CCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCGCTG TACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCGACCACTGGGTGTTCCGGCCA GGGCACCAAGGTGGAATCAAG
Легкая цепь	70	EAVVTQSPATLSLSPGERATLSCRSTGAVTTSNYAIWVQEKPG QAPRGLIGGTNNRAPGIPARFSGSLSGDDATLTISSLQPEDFAV YFCALWYSDHWVFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	71	GAAGCCGTCGTGACACAGAGCCCTGCCACCCTGTCAGTCTGAGCCC TGGCGAAAGAGCCACCCTGAGCTGCAGATCTAGCACCGGCGCTG TGACCACCAGCAACTACGCCATCTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGC CAGGCTCCCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAATAGAGCCCC TGGCATCCCCGCCAGATTACAGCGATCTCTGTCTGGCGACGACG CCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCGCTG TACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCGACCACTGGGTGTTCCGGCCA GGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCTGTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGC CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACA GCCAGGAGCGGTACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTAC AGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA GCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGACTTCAACAGGGGCGAGTGC
NEG313		
HCDR1 (по Кабату)	72	NYWIT
HCDR2 (по Кабату)	73	DFYFGGGSTNYNAKLQG
HCDR3 (по Кабату)	74	SPPQVAPFDY
HCDR1 (по Чотия)	75	GYTFNNY
HCDR2 (по Чотия)	76	YPGGGS
HCDR3 (по Чотия)	77	SPPQVAPFDY
VH	78	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFNNYITWVRQAPGQG LEWMGDFYFGGGSTNYNAKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPQVAPFDYWGQGLTVTVSS
ДНК, кодирующая VH	79	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTA ACAACACTAGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGCGACTTCTACCTGCGGCGGCAGCACCAA CTACAACGCCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTGACCCTGGACA

		CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCCGTGATTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGCCCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCT
Тяжелая цепь	80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFNYYWITWVRQAPGQG LEWMGDFYPGGSTNYNAKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPPQVAPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ДНК, кодирующая тяжелую цепь	81	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTTCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTA ACAACACTGGATCACCTGGGTGGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGGACTTCTACCTGGCGGGCAGCACCAA CTACAAACGCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCCGTGATTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGCCCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCC AGCAGCAAGAGCACAGCGGGCCAGCCGCGCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGTGCTG CAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGA GCTGCTGGGGGACCCCTCCGTGTTCTGTCCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGTGACACGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCCCTCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAAACAACATAAGACCACC CCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC GCTGCAGCGTGTGACAGGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
LCDR1 (по Кабату)	82	QASDYIYHWLG
LCDR2 (по Кабату)	83	GASGLET
LCDR3 (по Кабату)	84	QQYWSTPWT
LCDR1 (по Чотия)	85	SDYIYHW
LCDR2 (по	86	GAS

Чотия)		
LCDR3 (по Чотия)	87	YWSTPW
VL	88	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASDYLYHWLWYQQKPKAP KLLISGASGLETGVPSRFRSGSGSGKDYFTFTISSLQPEDIATYYC QQYWSTPWTFGQGTKLEIK
ДНК, кодирующая VL	89	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGGGTGACCATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCT ACCACTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCTCCGGTCTGGAACCCGGCGTGCC AAGCAGATTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCACCCCTGGACCTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAATCAAG
Легкая цепь	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASDYLYHWLWYQQKPKAP KLLISGASGLETGVPSRFRSGSGSGKDYFTFTISSLQPEDIATYYC QQYWSTPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	91	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGGGTGACCATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCT ACCACTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCTCCGGTCTGGAACCCGGCGTGCC AAGCAGATTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCACCCCTGGACCTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCT TCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCCAGCGTG GTGTGCTGCTGAACAАCTTCTACCCCGGGAGGCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGA GCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCTGCGAGGTGACCCACCGGGCTGTCCAGCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
NEG315		
HCDR1 (по Кабату)	92	NYWIT
HCDR2 (по Кабату)	93	DFYPGGGNTNYNAKLQG
HCDR3 (по Кабату)	94	SPPQVAPFDY
HCDR1 (по Чотия)	95	GYTFTNY
HCDR2 (по Чотия)	96	YPGGGN
HCDR3 (по Чотия)	97	SPPQVAPFDY
VH	98	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYWITWVRQAPGQG LEWMGDFYPGGGNTNYNAKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPQVAPFDYWGQGLVTVSS

ДНК, кодирующая VH	99	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTTA CCAACTACTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCGACTTCTACCCTGGCGGGCAACACCAA CTACAACGCCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCCTACATGGAAGTGGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCCGTGATTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGCCCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCT
Тяжелая цепь	100	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWITWVRQAPGQG LEWMGDFYPGGNTNNAKLQGRVLTVDVSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPQVAPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALP QSSGLYLSLVVTVPSLSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDITLMI SRTPETV CV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYF LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYHTQ KSLSLSPGK
ДНК, кодирующая тяжелую цепь	101	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTTA CCAACTACTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCGACTTCTACCCTGGCGGGCAACACCAA CTACAACGCCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCCTACATGGAAGTGGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCCGTGATTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGCCCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCCAGCCGCGCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGTGCTG CAGAGCAGCGCCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGA GCTGTGGGGGACCCCTCCGTGTCTCTGTCCCCCAAGCCCA AGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAGGACCCAGAGGTGAAGTTCACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGTGACACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG CAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCCCTCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACC CCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGTGACAGGCGCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
LCDR1 (по Кабату)	102	QASEYIYNWLG
LCDR2 (по Кабату)	103	GASGLET
LCDR3 (по	104	QYWPWT

Кабату)		
LCDR1 (по Чотия)	105	SEYIYNW
LCDR2 (по Чотия)	106	GAS
LCDR3 (по Чотия)	107	YWSTPW
VL	108	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASEYIYNWLGWYQQKPKAP KLLISGASGLETGVPSPRFRSGSGSKDYFTFISSLQPEDIATYYC QQYWSTPWTFGQGTKLEIK
ДНК, кодирующая VL	109	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGGGTGACCATCACCTGTCAAGCCAGCGAATACATCT ACAACCTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCTCCGGTCTGGAAACCGCGTGCC AAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCACCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAAATCAAG
Легкая цепь	110	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASEYIYNWLGWYQQKPKAP KLLISGASGLETGVPSPRFRSGSGSKDYFTFISSLQPEDIATYYC QQYWSTPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	111	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGGGTGACCATCACCTGTCAAGCCAGCGAATACATCT ACAACCTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCTCCGGTCTGGAAACCGCGTGCC AAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCACCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAAATCAAGGCTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCT TCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGA GCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
NEG318		
HCDR1 (по Кабату)	112	SFWIT
HCDR2 (по Кабату)	113	DIYPPGATTNYNEKLQG
HCDR3 (по Кабату)	114	SPPQVGPFYD
HCDR1 (по Чотия)	115	GYTFTSF
HCDR2 (по Чотия)	116	YPPGAT
HCDR3 (по Чотия)	117	SPPQVGPFYD

Чотия)		
VH	118	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFITFWITWVRQAPGQG LEWMGDIYPGGATTNYNEKIQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPQVGFDFYWGQGLVTVSS
ДНК, кодирующая VH	119	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTTGCAGGCCAGCGGCTATACCTTCA CCAGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCGACATCTACCCTGGCGGCCACCACCAA CTACAACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGGCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCT
Тяжелая цепь	120	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFITFWITWVRQAPGQG LEWMGDIYPGGATTNYNEKIQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPQVGFDFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAPVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPK SCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SSKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHQ KSLSLSPGK
ДНК, кодирующая тяжелую цепь	121	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTTGCAGGCCAGCGGCTATACCTTCA CCAGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCGACATCTACCCTGGCGGCCACCACCAA CTACAACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGGCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCTGCTAGCACCAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCGTGACCGTGTCTTGGAAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCCGCTGCTG CAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCAGCCCCAGA GCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTCCCCCAAGCCCA AGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG CAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACC CCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC GCTGCAGCGTGTGACAGGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
LCDR1 (по	122	QASDYIYHWLA

Кабату)		
LCDR2 (по Кабату)	123	GASSLET
LCDR3 (по Кабату)	124	QQYWSIPWT
LCDR1 (по Чотия)	125	SDYIYHW
LCDR2 (по Чотия)	126	GAS
LCDR3 (по Чотия)	127	YWSIPW
VL	128	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASDYIYHWLAWYQQKPKAP KLLISGASSLETGVPSPRFGSGSGKDYFTFTISSLQPEDIATYYC QQYWSIPWTFGQGTKLEIK
ДНК, кодирующая VL	129	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCT ACCACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCTCCAGTCTGGAACCCGGCGTGCC AAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCATCCCCTGGACCTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAATCAAG
Легкая цепь	130	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASDYIYHWLAWYQQKPKAP KLLISGASSLETGVPSPRFGSGSGKDYFTFTISSLQPEDIATYYC QQYWSIPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLS STLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	131	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCT ACCACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCTCCAGTCTGGAACCCGGCGTGCC AAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCATCCCCTGGACCTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCT TCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGA GCCTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCTCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGGCAGTGC
NEG319		
HCDR1 (по Кабату)	132	SEWIT
HCDR2 (по Кабату)	133	DIYPGGANTNYNEKLQG
HCDR3 (по Кабату)	134	SPPQVGPFYD
HCDR1 (по Кабату)	135	GYTFTSF

Чотия)		
HCDR2 (по Чотия)	136	YPGGAN
HCDR3 (по Чотия)	137	SPPQVGFDFY
VH	138	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITFWITWVRQAPGQG LEWMGDIYPGGANTNYNEKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPQVGFDFYWGQGLVTVSS
ДНК, кодирующая VH	139	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGTATACCTTCA CCAGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCGACATCTACCTGGCGGCCCAACACCAA CTACAACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGGCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCT
Тяжелая цепь	140	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITFWITWVRQAPGQG LEWMGDIYPGGANTNYNEKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARSPQVGFDFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ДНК, кодирующая тяжелую цепь	141	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGG CGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGTATACCTTCA CCAGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCGACATCTACCTGGCGGCCCAACACCAA CTACAACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACA CCAGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCTCCTCAGGT GGGCCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGT CCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCTGGAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGCCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACTGCCCCCTGCCAGCCCCAGA GCTGCTGGGGGACCCTCCGTGTCTCTGTCCCCCAGCCCA AGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG GACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCAC CCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCTCTGTACAGCAA

		GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
LCDR1 (по Кабату)	142	QASEYIINWLA
LCDR2 (по Кабату)	143	GATGLET
LCDR3 (по Кабату)	144	QQYWSIPWT
LCDR1 (по Чотия)	145	SEYIINW
LCDR2 (по Чотия)	146	GAT
LCDR3 (по Чотия)	147	YWSIPW
VL	148	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASEYIINWLAWYQQKPKAP KLLISGATGLETGVPSPRFSGSGSKDYFTFTISLQPEDIATYYC QQYWSIPWTFGQGTKLEIK
ДНК, кодирующая VL	149	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCAGCCAGCGAATACATCA TAAACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCACCGGTCTGGAAACCGCGTGCC AAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCATCCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAATCAAG
Легкая цепь	150	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASEYIINWLAWYQQKPKAP KLLISGATGLETGVPSPRFSGSGSKDYFTFTISLQPEDIATYYC QQYWSIPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ДНК, кодирующая легкую цепь	151	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCAGCCAGCGAATACATCA TAAACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATTAGCGGAGCCACCGGTCTGGAAACCGCGTGCC AAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTACTGGTCCATCCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTATCT TCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCGGGAGGCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGA CGGTACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGGAGTGC

Другие антитела по изобретению включают те, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, мутированы, но имеют по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, или 95% идентичности с последовательностями, описанными в табл. 1. Некоторые варианты осуществления включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот мутированы в переменных областях по сравнению с переменными областями, приведенными в последовательностях, описанных в табл. 1, при сохранении по существу такой же антигенсвязывающей активности.

Поскольку каждое из этих антител может связываться с ANGPTL4, то последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности) могут быть "скомбинированы и подобраны" с целью создания других ANGPTL4-связывающих антител по изобретению. Такие "скомбинированные и подобранные" ANGPTL4-связывающие антитела могут быть протестированы с использованием методов анализа связывания, известных в данной области (например, твердофазного ИФА, и других методов анализа, описанных в разделе примеров). При комбинировании и подборе этих цепей последовательность VH из конкретной пары VH/VL должна быть заменена последовательностью структурно аналогичной VH. Аналогичным образом полноразмерная последовательность тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерных тяжелой и легкой цепей должна быть заменена последовательностью структурно аналогичной полноразмерной тяжелой цепи. Аналогично последователь-

ность VL из конкретной пары VH/VL должна быть заменена последовательностью структурно аналогичной VL. Аналогичным образом полноразмерная последовательность легкой цепи из конкретной пары полноразмерных тяжелой и легкой цепей должна быть заменена последовательностью структурно аналогичной полноразмерной легкой цепи.

Соответственно в одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей области, имеющим вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148, где антитело специфично связывается с ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека).

Более конкретно в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей области, имеющим вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, содержащим аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 13 и 23; 38 и 48; 58 и 68; 78 и 88; 98 и 108, 118 и 128, или 138 и 148 соответственно.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к

(i) выделенному антителу, содержащему полноразмерную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120 и 140, и полноразмерную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая была оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130 и 150; или

(ii) функциональному белку, содержащему его антигенсвязывающий участок.

Более конкретно в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей области, имеющим тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 15 и 25; 28 и 25; 40 и 50; 60 и 70; 80 и 90; 100 и 110; 120 и 130; или 140 и 150 соответственно.

Термины "определяющая комплементарность" и "CDR", используемые в данном описании, относятся к последовательности аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. В общем в каждой вариабельной области тяжелой цепи присутствует по три CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и по три CDR присутствует в каждой вариабельной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR могут быть легко определены с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая те, которые описаны в Rabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации по Кабату), Al-Lazikani et al. (1997), JMB 273,927-948 (система нумерации по Чотия).

Например, в соответствии с номенклатурой Кабата аминокислотные остатки CDR антитела FF1 в вариабельном домене тяжелой цепи (VH) пронумерованы 31-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2) и 99-104 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене легкой цепи (VL) пронумерованы 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). В соответствии с системой нумерации по Чотия аминокислотные остатки CDR в VH пронумерованы 2-6-32 (HCDR1), 52-57 (HCDR2) и 99-104 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). При объединении определений CDR по системам нумерации Кабата и Чотия получается, что CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2) и 90-104 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к ANGPTL4-связывающим антителам, которые содержат CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в табл. 1, или их комбинации. Аминокислотные последовательности VH CDR1 антител показаны в SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112 и 132. Аминокислотные последовательности VH CDR2 антител показаны в SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113 и 133. Аминокислотные последовательности VH CDR3 антител показаны в SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114 и 134. Аминокислотные последовательности VL CDR1 антител показаны в SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142. Аминокислотные последовательности VL CDR2 антител показаны в SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143. Аминокислотные последовательности VL CDR3 антител показаны в SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144. Эти CDR-области указаны с использованием системы Кабата.

В качестве альтернативы при использовании определения с помощью системы Чотия (Al-Lazikani et al. (1997), JMB 273,927-948) аминокислотные последовательности VH CDR1 антител показаны в SEQ ID NO: 10, 35, 55, 75, 95, 115 и 135. Аминокислотные последовательности VH CDR2 антител показаны в SEQ ID NO: 11, 36, 56, 76, 96, 116 и 136. Аминокислотные последовательности VH CDR3 антител показаны в SEQ ID NO: 12, 37, 57, 77, 97, 117 и 137. Аминокислотные последовательности VL CDR1 антител показаны в SEQ ID NO: 20, 45, 65, 85, 105, 125 и 145. Аминокислотные последовательности VL CDR2 антител показаны в SEQ ID NO: 21, 46, 66, 86, 106, 126 и 146. Аминокислотные последовательности VL CDR3 антител показаны в SEQ ID NO: 22, 47, 67, 87, 107, 127 и 147.

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с ANGPTL4 и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается, прежде всего, областями CDR-1, -2 и -3, последовательности CDR-1, -2 и -3 из VH и последовательности CDR-1, -2 и -3 из VL могут быть "скомбинированы и подобраны" (т.е., CDR из различных антител могут быть скомбинированы и подобраны, хотя предпочтительно, чтобы для создания других связывающих ANGPTL4 молекул по изобретению каждое антитело содержало CDR-1, -2 и -3 из VH и CDR-1, -2 и -3 из VL). Такие "скомбинированные и подобранные" ANGPTL4-связывающие антитела могут быть протестированы с использованием методов анализа связывания, известных в данной области, и тех, что описаны в примерах (например, твердофазный ИФА, SET, Biacore). При комбинировании и подборе последовательностей VH CDR, последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VH должны быть заменены последовательностями структурно аналогичных CDR. Аналогичным образом при комбинировании и подборе последовательностей VL CDR последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VL должны быть заменены последовательностью структурно аналогичной CDR. Специалисту в данной области будет сразу очевидно, что новые последовательности VH и VL могут быть созданы путем замены одной или нескольких последовательностей CDR из VH и/или VL структурно аналогичными последовательностями из последовательностей CDR, приведенных в данном документе для моноклональных антител по настоящему изобретению. В дополнение к вышесказанному в одном варианте осуществления антигенсвязывающие фрагменты антител, описанных в настоящем документе, могут содержать CDR-1, -2 и -3 из VH или CDR-1, -2 и -3 из VL, где фрагмент связывается с ANGPTL4 в виде одного переменного домена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь последовательности тяжелых и легких цепей гуманизированных антител, описанных в табл. 1. Более конкретно антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь последовательность тяжелых и легких цепей антител NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318 и NEG319.

В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL4, содержат CDR1 переменной области тяжелой цепи, CDR2 переменной области тяжелой цепи, CDR3 переменной области тяжелой цепи, CDR1 переменной области легкой цепи, CDR2 переменной области легкой цепи и CDR3 переменной области легкой цепи в соответствии с определением Кабата, описанные в табл. 1. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL4, содержат CDR1 переменной области тяжелой цепи, CDR2 переменной области тяжелой цепи, CDR3 переменной области тяжелой цепи, CDR1 переменной области легкой цепи, CDR2 переменной области легкой цепи и CDR3 переменной области легкой цепи в соответствии с определением Чотия, описанные в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ANGPTL4, включающее CDR1 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 7; CDR2 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 8; CDR3 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 9; CDR1 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 17; CDR2 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 18; и CDR3 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 19.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ANGPTL4, включающее CDR1 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 32; CDR2 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 33; CDR3 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 34; CDR1 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 42; CDR2 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 43; и CDR3 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 44.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ANGPTL4, включающее CDR1 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 52; CDR2 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 53; CDR3 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 54; CDR1 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 62; CDR2 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 63; и CDR3 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 64.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ANGPTL4, включающее CDR1 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 72; CDR2 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 73; CDR3 переменной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 74; CDR1 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 82; CDR2 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 83; и CDR3 переменной области легкой цепи из SEQ ID NO: 84.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ANGPTL4, включающее CDR1 переменной области тяжелой цепи из

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с ANGPTL4, описанные в табл. 1. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с ANGPTL4, являются NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319.

Гомологичные антитела.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, включающим аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям, описанным в табл. 1, и антитело связывается с белком ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека и яванского макака) и сохраняет желательные функциональные свойства антител, описанных в табл. 1.

Например, изобретение относится к выделенному антителу или его функциональному антигенсвязывающему фрагменту, содержащим варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи, где варибельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138; варибельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 23, 48, 68, 88, 108, 128, 148; и антитело специфично связывается с ANGPTL4 (например, ANGPTL4 человека и яванского макака). В некоторых аспектах настоящего изобретения последовательности тяжелой и легкой цепей дополнительно содержат последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с определением Кабата, например SEQ ID NO: 7, 8, 9, 17, 18 и 19 соответственно. В некоторых других аспектах настоящего изобретения последовательности тяжелой и легкой цепей дополнительно содержат последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с определением Чотия, например SEQ ID NO: 10, 11, 12, 20, 21 и 22 соответственно.

В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, указанным в табл. 1. В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть идентичными за исключением аминокислотных замен не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных позициях. Антитело, имеющее VH- и VL-области, имеющие высокую (т.е. 80% или выше) идентичность с областями VH и VL, описанными в табл. 1, могут быть получены с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118, 118 или 138 и SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 или 148 соответственно, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела на сохранение функции с использованием функциональных тестов, описанных в данном документе.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут иметь 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностями, указанными в табл. 1. Антитело, имеющее полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь, имеющие высокую (т.е. 80% или выше) идентичность с полноразмерной тяжелой цепью из любой из SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120, 133 или 140, и полноразмерной легкой цепью из любой из SEQ ID NO: 25, 25, 50, 70, 90, 110, 130 или 150, могут быть получены с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих такие полипептиды, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела на сохранение функции с использованием функциональных тестов, описанных в данном документе.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут иметь 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностями, указанными в табл. 1.

В других вариантах осуществления, нуклеотидные последовательности варибельных областей тяжелой цепи и/или варибельных областей легкой цепи могут иметь 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с последовательностями, указанными в табл. 1.

Используемый в данном описании, процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, общих для этих последовательностей (т.е. % идентичности равен числу идентичных положений/общее число положений $\times 100$), принимая во внимание количество разрывов и длину каждого разрыва, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, описанного в приведенных ниже примерах, не ограничивающих изобретение.

Дополнительно или в качестве альтернативы, белковые последовательности по настоящему изобретению могут быть также использованы в качестве "запрашивающей последовательности" для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, с целью идентификации родственных последова-

тельностей. Например, такой поиск может быть выполнен с помощью программы BLAST (версия 2.0) по Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215:403-10.

Антитела с консервативными модификациями.

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или несколько из этих последовательностей CDR имеют определенные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в данном документе, или их консервативные модификации и где антитела сохраняют желаемые функциональные свойства ANGPTL4-связывающих антител по изобретению.

Соответственно настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, состоящим из переменной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где аминокислотные последовательности CDR1 переменной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112 и 132, а также их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR2 переменной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113 и 133, а также их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR3 переменной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114 и 134, а также их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR1 переменной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142, а также их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR2 переменной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143, а также их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR3 переменной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144, а также их консервативных модификаций; и антитело или его антигенсвязывающие фрагменты специфично связываются с ANGPTL4.

В других вариантах осуществления изобретения антитело по изобретению, оптимизированное для экспрессии в клетке млекопитающего, имеет последовательность полноразмерной тяжелой цепи и последовательность полноразмерной легкой цепи, где одна или несколько из этих последовательностей имеют определенные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в настоящем документе, или их консервативных модификаций, и где антитела сохраняют желаемые функциональные свойства ANGPTL4-связывающих антител по изобретению. Соответственно настоящее изобретение относится к выделенному антителу, оптимизированному для экспрессии в клетке млекопитающего, состоящему из полноразмерной тяжелой цепи и полноразмерной легкой цепи, где полноразмерная тяжелая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120 и 140, а также их консервативных модификаций; и полноразмерная легкая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130 и 150, а также их консервативных модификаций; и антитело специфично связывается с ANGPTL4 (например, с ANGPTL4 человека и яванского макака).

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с тем же эпитопом, что и ANGPTL4-связывающие антитела, описанные в табл. 1. Поэтому дополнительные антитела могут быть идентифицированы исходя из их способности конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание статистически значимым образом) с другими антителами по изобретению в анализах связывания ANGPTL4 (таких, как описанные в примерах). Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител по настоящему изобретению с белком ANGPTL4 показывает, что тестируемое антитело может конкурировать с этим антителом за связывание с ANGPTL4; так что такое антитело может в соответствии с неограничивающей теорией связываться с тем же или родственным (например, структурно сходным или близким в пространстве) эпитопом на белке ANGPTL4 подобно антителу, с которым оно конкурирует. В некотором варианте осуществления изобретения антитело, которое связывается с тем же эпитопом на ANGPTL4, что и антитела по настоящему изобретению, представляет собой гуманизированное антитело. Такие гуманизированные антитела могут быть получены и выделены, как описано в настоящем документе. В контексте данного документа антитело "конкурирует" за связывание, когда конкурирующее антитело ингибирует связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению с ANGPTL4 более чем на 50% (например, на 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) в присутствии эквимольной концентрации конкурирующего антитела.

В других вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению связываются с одним или несколькими эпитопами ANGPTL4. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитопы, с которыми связываются антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, являются линейными эпитопами. В других вариантах осуществления изобретения эпитопы, с которыми связываются антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, являются нелинейными конформационными эпитопами. Генно-инженерные и модифицированные антитела

Антитело по изобретению, кроме того, может быть получено с использованием антитела, имеющего одну или несколько последовательностей VH и/или VL, приведенных в данном описании, в качестве исходного материала для создания модифицированного антитела, где модифицированное антитело может иметь измененные свойства относительно исходного антитела. Антитело может быть сконструировано путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (например, в VH и/или в VL), например, в пределах одной или нескольких CDR-областей и/или в пределах одной или нескольких каркасных областей. Дополнительно или в качестве альтернативы антитело может быть создано генно-инженерным образом путем модификации остатков в константной области (в константных областях), например, с целью изменения эффекторной функции (эффекторных функций) антитела.

Одним типом генно-инженерных модификаций переменной области, которые могут быть выполнены, является пересадка CDR-областей. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарных областях (CDR) тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности CDR являются более переменными у разных антител, чем последовательности других участков (вне CDR). Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитела с антигеном, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфичных природных антител, путем создания экспрессионных векторов, которые включают последовательности CDR из специфичного природного антитела, пересаженные в каркасные последовательности другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al., 1998, *Nature*, 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. USA*, 86:10029-10033; патент США № 5225539 на имя Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen et al.).

Соответственно еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112 и 132; последовательности CDR2, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113 и 133; последовательности CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114 и 134 соответственно; и переменную область легкой цепи, имеющую последовательности CDR1, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142; последовательности CDR2, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143; и последовательности CDR3, состоящие из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144 соответственно. Таким образом, такие антитела содержат CDR-последовательности VH и VL моноклональных антител, но могут содержать разные каркасные последовательности из этих антител.

Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных данных, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, зародышевые последовательности ДНК для генов переменных областей тяжелых и легких цепей антител человека можно найти в базе данных зародышевых последовательностей человека "VBase" (доступна в интернете по адресу: mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также в Rabat, E.A. et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S., Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242*; Tomlinson, I.M. et al., 1992, *J. Mol. Biol.*, 227:776-798; и Cox, J.P.L. et al., 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24:827-836; содержание которых прямо включено в данный документ путем ссылки.

Примером каркасных последовательностей для использования в антителах по изобретению являются каркасные последовательности, которые структурно подобны каркасным последовательностям, используемым в выбранных антителах по изобретению, например консенсусным последовательностям и/или каркасным последовательностям, используемым в моноклональных антителах по изобретению. Последовательности CDR-1, -2 и -3 из VH и последовательности CDR-1, -2 и -3 из VL могут быть пересажены в каркасные области, которые имеют последовательность идентичную с последовательностью гена иммуноглобулина зародышевой линии, из которого получена каркасная последовательность, или последовательности CDR могут быть пересажены в каркасные области, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях выгодной является мутация остатков в каркасных областях для поддержания или повышения антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США № 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370 на имя Queen и др.). Каркасные области, которые могут быть использованы в качестве основы, на которой создаются антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, включают, но не ограничиваются VH1A, VH1B, VH3, Vk1, V12 и Vk2. Дополнительные каркасные последовательности известны в данной области и могут быть найдены, например, в базе данных vBase в интернете по адресу: vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1.

Соответственно вариант осуществления настоящего изобретения относится к выделенным ANGPTL4-связывающим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим переменную

ную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 и 138, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений в каркасной области таких последовательностей, и дополнительно содержащие вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 и 148, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений в каркасной области таких последовательностей.

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH-и/или VL-областей с целью улучшения одной или нескольких характеристик связывания (например, аффинности) у представляющего интерес антитела, известное как "созревание аффинности". Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез могут быть выполнены для введения мутации(й) и влияния на связывание антитела или другое функциональное свойство, представляющие интерес, которые можно оценить методами анализа *in vitro* или *in vivo*, описанными в настоящем документе и приведенными в разделе примеров. Могут быть введены консервативные модификации (описанные выше). Эти мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеций. Кроме того, как правило, в пределах CDR-области меняют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков.

Соответственно в другом варианте осуществления изобретение относится к выделенным ANGPL4-связывающим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, состоящим из вариабельной области тяжелой цепи, имеющей область VH CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, имеющей SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112 и 132, или аминокислотной последовательности, имеющей одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112, 112 и 132; область VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113 и 133, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113 и 133; область VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114, 114 и 134, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114 и 134; область VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142; область VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143; и область VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144.

Соответственно в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным ANGPL4-связывающим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, состоящим из вариабельной области тяжелой цепи, имеющей область VH CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, имеющей SEQ ID NO: 10, 35, 55, 75, 95, 115 и 135, или аминокислотной последовательности, имеющей одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 10, 35, 55, 75, 95, 115 и 135; область VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 36, 56, 76, 96, 116 и 136, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 11, 36, 56, 76, 96, 116 и 136; область VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 37, 57, 77, 97, 117 и 137, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 12, 37, 57, 77, 97, 117 и 137; область VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 45, 65, 85, 105, 125 и 145, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 20, 45, 65, 85, 105, 125 и 145; область VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 46, 66, 86, 106, 126 и 146, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 21, 46, 66, 86, 106, 126 и 146; и область VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 47, 67, 87, 107, 127 и 147, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 22, 47, 67, 87, 107, 127 и 147.

Пересадка антигенсвязывающих доменов в альтернативные каркасы и основы.

Разнообразные каркасы и основы антител/иммуноглобулинов можно использовать, пока полученный полипептид включает в себя по меньшей мере одну связывающую область, которая специфично связывается с ANGPTL4. Такие каркасы или основы включают в себя 5 основных идиотипов человеческих иммуноглобулинов или их фрагменты и включают иммуноглобулины других животных, предпочтительно "гуманизированные" в той или иной степени. В связи с этим особый интерес представляют антитела, состоящие из одиночной тяжелой цепи, такие как найденные у верблюдовых. Специалисты в данной области продолжают поиск и создание новых каркасов, основ и их фрагментов.

В одном аспекте изобретение относится к созданию антител на неиммуноглобулиновой основе с использованием неиммуноглобулиновой основы, в которую могут быть пересажены CDR-области по изобретению. Могут быть использованы известные или созданные в будущем неиммуноглобулиновые каркасы и основы, пока они содержат связывающую область, специфичную в отношении белка-мишени ANGPTL4. Известные неиммуноглобулиновые каркасы или основы включают, но не ограничиваются ими, фибронектин (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), анкирин (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), доменные антитела (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, and Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium), липокалин (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), низкомолекулярные модульные иммунофармацевтические препараты (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), максибоди (Avidia, Inc., Mountain View, CA), белок А (Affibody AG, Sweden) и аффилин (гамма-кристаллин или убиквитин) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany).

Фибронектиновые каркасы основаны на домене фибронектина III типа (например, десятом модуле фибронектина III типа (10 Fn3-домене)). Домен фибронектина III типа имеет 7 или 8 бета-цепей, которые распределены между двумя бета-листами, которые самоупаковываются напротив друг друга, образуя ядро белка, и дополнительно содержит петли (аналогичные CDR), которые соединяют бета-цепи друг с другом и являются гидрофильными. По меньшей мере по три таких петли присутствуют на каждом краю сэндвича из бета-листов, где край является границей белка, перпендикулярной направлению бета-цепей (см. US 6818418). Эти фибронектиновые основы не являются иммуноглобулинами, хотя общая укладка близко напоминает наименьший функциональный фрагмент антитела, переменную область тяжелой цепи, которая содержит полный блок распознавания антигена в IgG верблюдов и лам. Благодаря этой структуре неиммуноглобулиновое антитело имитирует антигенсвязывающие свойства, которые сходны по своей природе и аффинности с таковыми у антител. Эти каркасы могут быть использованы в стратегии рандомизации и перетасовки петель *in vitro*, которая аналогична процессу созревания аффинности антител *in vivo*. Эти молекулы на основе фибронектина могут быть использованы в качестве основы, когда области петель молекулы могут быть замещены CDR по изобретению с использованием стандартных методик клонирования.

Анкириновая технология основана на использовании белковых модулей на основе анкириновых повторов в качестве каркасов, несущих переменные области, которые могут быть использованы для связывания с различными мишенями. Модуль анкириновых повторов представляет собой 33-аминокислотный полипептид, состоящий из двух антипараллельных α -спиралей и β -поворотов. Связывание переменных областей в основном оптимизируется с помощью рибосомного дисплея.

Авимеры получают из природных белков, содержащих А-домен, таких как LRP-1. Эти домены используются в природе для белок-белковых взаимодействий, и у человека найдены более 250 белков, структурно основанных на А-доменах. Авимеры состоят из целого ряда различных "А-доменных" мономеров (2-10), соединенных аминокислотными линкерами. Могут быть созданы авимеры, которые могут связываться с антигеном-мишенью, с использованием методики, описанной, например, в публикациях патентных заявок США № 20040175756, 20050053973, 20050048512 и 20060008844.

Аффинные лиганды Affibody представляют собой небольшие простые белки, состоящие из трех-спирального пучка на базе каркаса одного из IgG-связывающих доменов белка А. Белок А представляет собой поверхностный белок из бактерии *Staphylococcus aureus*. Данный каркасный домен состоит из 58 аминокислот, 13 из которых рандомизируют с целью создания библиотек Affibody с большим числом вариантов лиганда (см., например, US 5831012). Молекулы Affibody имитируют антитела, они имеют молекулярную массу 6 кД по сравнению с молекулярной массой антител, которая составляет 150 кД. Несмотря на маленький размер сайт связывания молекул Affibody аналогичен таковому у антитела.

Антикарины представляют собой продукты, разработанные компанией Pieris ProteoLab AG. Они получены из липокалинов, широко распространенной группы небольших и устойчивых белков, которые, как правило, участвуют в физиологическом транспорте или накоплении химически чувствительных или нерастворимых соединений. Ряд природных липокалинов присутствует в тканях или жидкостях тела человека. Структура белка напоминает иммуноглобулины гипервариабельными петлями в верхней части жесткого скелета. Однако в отличие от антител или их рекомбинантных фрагментов липокарины состоят из одной полипептидной цепи из 160-180 аминокислотных остатков, будучи только незначительно крупнее одного иммуноглобулинового домена. Набор из четырех петель, который создает связывающий карман, демонстрирует выраженную структурную пластичность и допускает множество боковых цепей. Таким образом, сайт связывания может быть видоизменен запатентованным способом для того, чтобы распознавать заданные молекулы-мишени различной формы с высокой аффинностью и специфичностью.

Один белок из семейства липокалинов, билинсвязывающий белок (ВВР) из *Pieris brassicae* используют для создания антикалинов путем мутации набора из четырех петель. Одним примером патентных заявок, описывающих антикалины, является РСТ-публикация WO № 199916873.

Молекулы аффилинов представляют собой небольшие неиммуноглобулиновые белки, которые разработаны для специфичного связывания с белками и низкомолекулярными соединениями. Новые молекулы аффилинов можно очень быстро отобрать из двух библиотек, которые основаны на различных каркасных белках человека. Молекулы аффилинов не имеют никакой структурной гомологии с иммуноглобулиновыми белками. В настоящий момент используются две аффилиновых основы, одна из которых представляет собой гамма-кристаллин, человеческий структурный белок из хрусталика глаза, а другая представляет собой белки из "убиквитинового" суперсемейства. Обе основы являются очень маленькими, имеют высокую термостабильность и в значительной степени устойчивы к изменениям pH и денатурирующим агентам. Данная высокая стабильность в основном обусловлена расширенной β -складчатой структурой этих белков. Примеры белков на основе гамма-кристаллинов описаны в WO 200104144, а примеры "убиквитинподобных" белков описаны в WO 2004106368.

Миметики белковых эпитопов (РЕМ) представляют собой имеющие средний размер, циклические, пептидоподобные молекулы (мол. вес. 1-2 кДа), имитирующие бета-шпильчатые вторичные структуры белков основную вторичную структуру, участвующую в белок-белковых взаимодействиях.

Настоящее изобретение относится к полностью человеческим антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4. По сравнению с химерными или гуманизированными антителами человеческие ANGPTL4-связывающие антитела по изобретению имеют дополнительно сниженную антигенность при введении человеку.

Антитела верблюдовых.

Белки антител, полученные из представителей семейства двугорбых и одногорбых верблюдов (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), включая представителей животных Нового Света, таких как различные виды лам (*Lama pacos*, *Lama glama* и *Lama vicugna*), были охарактеризованы в отношении их размера, сложности структуры и антигенности в отношении человека. Было найдено, что некоторые IgG-антитела из этого семейства млекопитающих в природе лишены легких цепей и, поэтому, отличаются по структуре от типичной четырехцепочечной четвертичной структуры с двумя тяжелыми и двумя легкими цепями, характерной для антител других животных. См. РСТ/EP93/02214 (WO 94/04678, опубл. 3 марта 1994 г.).

Область верблюжьего антитела, представляющая собой небольшой индивидуальный варибельный домен, обозначаемый как V_HH, может быть получена генно-инженерными методами, давая небольшой белок, обладающий высокой аффинностью к мишени, что в результате приводит к образованию низкомолекулярного антителоподобного белка, называемого "верблюжьим нанотелом". См. патент США № 5759808, выданный 2 июня 1998 г.; см. также Stijlemans, B. et al., 2004, J. Biol. Chem., 279:1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003, Nature, 424:783-788; Pleschberger, M. et al., 2003, Bioconjugate Chem., 14:440-448; Cortez-Retamozo, V. et al., 2002, Int. J. Cancer., 89:456-62; и Lauwereys, M. et al., 1998, EMBO J., 17:3512-3520. Сконструированные библиотеки верблюжьих антител и фрагментов антител доступны на коммерческой основе, например, от Ablynx, Ghent, Belgium. Аналогично другим антителам, полученным из животных, аминокислотная последовательность верблюжьего антитела может быть изменена рекомбинантно, давая последовательность в большей степени напоминающую последовательность антитела человека, т.е. нанотело может быть "гуманизированным". Таким образом, естественная низкая антигенность верблюжьих антител у людей может быть дополнительно снижена.

Верблюжье нанотело имеет молекулярную массу, составляющую примерно 1/10 от молекулярной массы IgG человека, а физический диаметр белка составляет лишь несколько нанометров. Одной из связанных с малым размером особенностей является способность верблюжьих антител связываться с антигенными сайтами, которые являются функционально незаметными для более крупных антител, т.е. верблюжьего нанотела можно применять в качестве реагентов, выявляющих антигены, которые остаются скрытыми при использовании классических иммунологических методов и в качестве потенциальных терапевтических агентов. Таким образом, другой связанной с малым размером особенностью верблюжьего нанотела является способность ингибировать связывание со специфическим сайтом в бороздке или узкой расщелине белка-мишени, и поэтому их можно применять в качестве вещества, более напоминающего по своей функции классическое низкомолекулярное лекарственное средство, чем классическое антитело.

Небольшая молекулярная масса и компактный размер верблюжьих нанотел дополнительно обуславливают их очень высокую термостабильность, стабильность при экстремальных значениях pH и стабильность к протеолитическому расщеплению, а также их низкую антигенность. Еще одним следствием является то, что верблюжьего нанотела легко проникают из кровеносной системы в ткани и даже проникают через гематоэнцефалический барьер, и их можно применять для лечения заболеваний, поражающих нервную ткань. Нанотела могут облегчать также транспорт лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер. См. заявку на патент США 20040161738, опубл. 19 августа 2004 г. Эти признаки в сочетании с низкой антигенностью у человека свидетельствуют об их большом терапевтическом потенциале. Кроме того, эти молекулы можно полностью экспрессировать в прокариотических клетках, таких как

E.coli, а также их можно экспрессировать в виде слитых белков с бактериофагом, и они будут являться функционально активными.

Соответственно признаком настоящего изобретения является верблюжье антитело или нанотело, имеющее высокое сродство к ANGPTL4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения верблюжье антитело или нанотело естественным образом получают в животном из семейства верблюдовых, т.е. они вырабатываются верблюдовым после иммунизации с использованием ANGPTL4 или его пептидного фрагмента и способов, описанных в настоящем документе для других антител. В качестве альтернативы ANGPTL4-связывающее верблюжье нанотело создается генно-инженерным образом, т.е. продуцируется путем отбора, например, из фаговой библиотеки, представляющей соответственно мутированные белки верблюжьих нанотел, с использованием процедур "просеивания" с ANGPTL4 в качестве мишени, описанных в данном документе в примерах. Генно-инженерные нанотела могут дополнительно быть "улучшены" методами генной инженерии с целью достижения времени полужизни в реципиентах от 45 мин до двух недель. В конкретном варианте осуществления, верблюжье антитело или нанотело получают путем пересадки последовательностей CDR тяжелой или легкой цепи антител человека по изобретению в каркасные последовательности нанотела или однодоменного антитела, как описано, например, в РСТ/EP93/02214.

Биспецифичные молекулы и поливалентные антитела.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится биспецифичным или полиспецифичным молекулам, содержащим ANGPTL4-связывающее антитело или его фрагмент по изобретению. Антитело по изобретению или его антигенсвязывающие области могут быть дериватизированы другой функциональной молекулой (например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора)) или связаны с ней, образуя биспецифичную молекулу, который связывается по меньшей мере с двумя различными участками связывания или молекулами-мишенями. Антитело по изобретению может быть фактически дериватизировано или связано с несколькими другими функциональными молекулами с образованием полиспецифичных молекул, которые связываются с несколькими различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; такие полиспецифичные молекулы также охватываются термином "биспецифичная молекула", используемым в данном документе. Для создания биспецифичной молекулы по изобретению антитело по изобретению может быть функционально связано (например, химической связью, генетическим слиянием, нековалентной ассоциацией или иным образом) с одной или несколькими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептидный или связывающий миметик, так что в результате образуется биспецифичная молекула.

Соответственно настоящее изобретение включает биспецифичные молекулы, включающие по меньшей мере одну первую специфичность связывания в отношении ANGPTL4 и вторую специфичность связывания в отношении второго эпитопа-мишени. Например, второй эпитоп-мишень является еще одним эпитопом ANGPTL4, отличающимся от первого эпитопа-мишени.

Дополнительно в случае изобретения, в котором биспецифичная молекула является полиспецифичной, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания, в дополнение к первому и второму эпитопам-мишеням.

В одном варианте осуществления биспецифичные молекулы по изобретению включают в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент этого антитела, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело также может представлять собой димер легких или тяжелых цепей или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечная конструкция, как описано в патенте США 4946778 на имя Ladner et al.

Диантитела являются бивалентными, биспецифичными антителами, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, соединенные линкером, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание двух доменов на одной и той же цепи. Домены VH и VL образуют пары с комплементарными доменами другой цепи, таким образом создавая два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6444-6448; Poljak et al., 1994, Structure, 2:1121-1123). Диантитела можно получить путем экспрессии двух полипептидных цепей либо со структурой VHA-VLB и VHB-VLA (конфигурация VH-VL), либо со структурой VLA-VHB и VLB-VHA (конфигурация VL-VH) в одной клетке. Большинство из них могут быть проэкспрессированы в растворимой форме в бактериях. Одноцепочечные димеры (scDb) получают путем соединения двух образующих диантитело полипептидных цепей с использованием линкера приблизительно из 15 аминокислотных остатков (см. Holliger and Winter, 1997, Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4):128-30; Wu et al., 1996, Immunotechnology, 2(1):21-36). scDb могут быть проэкспрессированы в бактериях в растворимой активной мономерной форме (см. Holliger and Winter, 1997, Cancer Immunol. Immunother., 45(34):128-30; Wu et al., 1996, Immunotechnology, 2(1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997, Immunotechnology, 3(2):83-105; Ridgway et al., 1996, Protein Eng., 9(7):617-21). Диантитело может быть слито с Fc с образованием "ди-диантитела" (см. Lu et al., 2004, J. Biol. Chem., 279 (4):2856-65).

Другие антитела, которые могут быть использованы в биспецифичных молекулах по изобретению, представляют собой мышиные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифичные молекулы могут быть получены путем конъюгации элементов, обуславливающих

специфичность связывания, с использованием способов, известных в данной области техники. Например, каждая специфичность связывания в биспецифичной молекуле может быть получена по отдельности, а затем они могут быть конъюгированы друг с другом. Когда элементом, обуславливающим специфичность связывания, являются белки или пептиды, множество связывающих или сшивающих агентов могут быть использованы для ковалентной конъюгации. Примеры сшивающих агентов включают белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дителиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al., 1984, J. Exp. Med., 160:1686; Liu, M.A. et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:8648). Другие способы включают описанные в Paulus, 1985, Behring Ins. Mitt., № 78, 118-132; Brennan et al., 1985, Science, 229:81-83; и Glennie et al., 1987, J. Immunol., 139:2367-2375). Конъюгирующими агентами являются SATA и сульфо-SMCC, оба коммерчески доступные от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если элементом, определяющим специфичность связывания, являются антитела, они могут быть конъюгированы с помощью сульфгидрильной связи между С-концевыми шарнирными областями двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область модифицирована, чтобы содержать нечетное число сульфгидрильных остатков, например один, перед конъюгацией.

В альтернативном варианте оба элемента, определяющие специфичности связывания, могут быть закодированы в одном векторе и экспрессируются и собираются в одной клетке-хозяине. Этот способ особенно подходит, когда биспецифичной молекулой является слитый белок mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')₂ или лиганд×Fab. Биспецифичная молекула по изобретению может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечную биспецифичную молекулу, содержащую две детерминанты связывания. Биспецифичные молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифичных молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США № 5258498 и в патенте США № 5482858.

Связывание биспецифичных молекул с их конкретными мишенями может быть подтверждено, например, твердофазным иммуноферментным анализом (твердофазным ИФА), радиоиммуноанализом (RIA), FACS-анализом, биологическим анализом (например, анализом ингибирования роста) или Вестерн-блот-анализом. Каждый из этих анализов, как правило, обнаруживает присутствие представляющих интерес комплексов белок-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного для комплекса, представляющего интерес.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к поливалентным соединениям, содержащим по меньшей мере два одинаковых или отличающихся антигенсвязывающих участков антител по изобретению, связывающихся с ANGPTL4. Антигенсвязывающие участки могут быть соединены друг с другом путем слияния белков или с помощью ковалентной или нековалентной связи. В качестве альтернативы способы связывания были описаны для биспецифичных молекул. Четырехвалентные соединения могут быть получены, например, с помощью сшивания антител по изобретению с использованием антитела, которое связывается с константными областями антител по изобретению, например, с Fc или шарнирной областью.

Образующие тримеры домены (тримеризующие) описаны, например, в патенте EP 1012280B1, принадлежащем BOREAN PHARMA APS. Пентамеризующие модули описаны, например, в PCT/EP97/05897.

Антитела с увеличенным временем полужизни.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4, которые имеют увеличенное время полужизни *in vivo*.

Многие факторы могут повлиять на время полужизни белка *in vivo*. Например, фильтрация в почках, метаболизм в печени, деградация протеолитическими ферментами (протеазами) и иммуногенные реакции (например, нейтрализация белка с помощью антител и поглощение макрофагами и дендритными клетками). Для увеличения времени полужизни антител по настоящему изобретению используются различные стратегии. Например, время полужизни может быть увеличено путем химического связывания с полиэтиленгликолем (ПЭГ), геCODE PEG, каркасом антитела, полисиаловой кислотой (PSA), гидроксипропилкрахмалом (HES), альбуминсвязывающими лигандами и углеводными экранами; путем генетического слияния с белками, связывающимися с сывороточными белками, такими как альбумин, IgG, FcRn и трансферрин; путем связывания (генетически или химически) с другими связывающими фрагментами, которые связываются с сывороточными белками, такими как нанотела, Fab, молекулы DARPIn, авимеры, молекулы Affibody и антикалины; путем генетического слияния с rPEG, альбумином, доменом альбумина, альбуминсвязывающими белками и Fc; или путем включения в наноносители, составы с замедленным высвобождением или медицинские устройства.

Чтобы продлить срок циркуляции антител в сыворотке *in vivo*, инертные полимерные молекулы, такие как высокомолекулярный ПЭГ, могут быть присоединены к антителам или их фрагменту с или без многофункционального линкера либо посредством сайт-специфичной конъюгации ПЭГ с N- или

С-концом антител, либо через эpsilon-аминогруппы, присутствующие на остатках лизина. Для ПЭГилирования антитела, антитело или его фрагмент, как правило, вступают в реакцию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. ПЭГилирование может быть осуществлено с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичного реакционноспособного водорастворимого полимера). Используемый в данном описании термин "полиэтиленгликоль" предназначен для включения любой из форм ПЭГ, которые были использованы для дериватизации других белков, таких как моно (C1-C10) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В некоторых вариантах осуществления изобретения ПЭГилируемое антитело является агликозилированным антителом. Будет использоваться дериватизация линейным или разветвленным полимером, которая приводит к минимальной потере биологической активности. Степень конъюгации можно тщательно контролировать с помощью SDS-PAGE и масс-спектрометрии с целью обеспечения надлежащей конъюгации молекул ПЭГ с антителами. Непрореагировавший ПЭГ может быть отделен от конъюгатов антитело-ПЭГ с помощью эксклюзионной или ионообменной хроматографии. ПЭГ-дериватизированные антитела могут быть протестированы на связывающую активность, а также на эффективность *in vivo* с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, с помощью иммунологических анализов, описанных в настоящем документе. Методы ПЭГилирования белков известны в данной области техники и могут быть применены к антителам по изобретению. См., например, EP 0154316 на имя Nishimura et al. и EP 0401384 на имя Ishikawa et al.

Другие модифицированные технологии ПЭГилирования включают технологию.

Восстанавливающей химически ортогональной направленной инженерии (ReCODE PEG), в которой имеющиеся определенные химические свойства боковые цепи включаются в биосинтезируемые белки в реконструированной системе, которая включает тРНК-синтетазу и тРНК. Эта технология позволяет включение более 30 новых аминокислот в биосинтезируемые белки в *E.coli*, дрожжах и клетках млекопитающих. тРНК включает чужеродную аминокислоту в любое место, где присутствует "янтарный" кодон, преобразуя "янтарный" кодон из стоп-кодона в тот, который обеспечивает включение аминокислоты с определенными химическими свойствами.

Технология рекомбинантного пэгилирования (rPEG) также может быть использован для увеличения времени полужизни в сыворотке. Эта технология включает в себя генетическое слияние 300-600-аминокислотного белкового неструктурированного хвоста с существующим фармацевтическим белком. Поскольку кажущаяся молекулярная масса такой неструктурированной белковой цепи примерно в 15 раз больше его фактической молекулярной массы, то время полужизни белка в сыворотке значительно увеличивается. В отличие от традиционного ПЭГилирования, которое требует химической конъюгации и повторной очистки, производственный процесс значительно упрощается, и продукт является гомогенным.

Полисиалирование представляет собой другую технологию, в которой для увеличения времени активной жизни и стабильности терапевтических белков и пептидов используется природный полимер полисиаловая кислота (PSA). PSA представляет собой полимер сиаловой кислоты (сахар). При использовании для доставки белков и пептидов в качестве терапевтического лекарственного средства полисиаловая кислота обеспечивает защитное микроокружение при конъюгации. Это увеличивает активную жизнь терапевтического белка в кровотоке и препятствует его узнаванию иммунной системой. Полимер PSA естественным образом присутствует в организме человека. Некоторые бактерии, которые эволюционировали в течение миллионов лет, используют его для покрытия своих стенок. Эти полисиалированные в природе бактерии в состоянии благодаря молекулярной мимикрии блокировать защитную систему организма. PSA, высшая природная технология экранирования, может быть легко получена из таких бактерий в больших количествах и с заранее определенными физическими характеристиками.

Бактериальная PSA является полностью неиммуногенной, даже в сочетании с белками, поскольку она химически идентична PSA в организме человека.

Другая технология включает в себя использование производных гидроксиэтилкрахмала ("HES"), связанных с антителами. HES представляет собой модифицированный природный полимер, полученный из крахмала восковой кукурузы, и он может метаболизироваться ферментами организма. Растворы HES обычно вводят для замещения недостаточного объема крови и для улучшения реологических свойств крови. HES-модификация антитела позволяет увеличивать время полужизни в кровотоке за счет повышения стабильности молекулы, а также за счет снижения почечного клиренса, что приводит к увеличению биологической активности. Варьируя различные параметры, такие как молекулярная масса HES, можно получить широкий диапазон конъюгатов антител и HES.

Антитела, имеющие увеличенное время полужизни *in vivo*, также могут быть созданы путем введения одной или нескольких аминокислотных модификаций (например, замены, вставки или делеции) в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно в Fc-домен или в шарнирный фрагмент Fc). См., например, международную публикацию WO 98/23289, международную публикацию № WO 97/34 631 и патент США № 6277375.

Кроме того, антитела могут быть конъюгированы с альбумином (например, сывороточным альбумином человека, HSA) для того, чтобы антитело или фрагмент антитела стали более стабильными *in vivo* или имели более длительное время полужизни *in vivo*. Эти методы хорошо известны в данной области, см., например, международные публикации № WO 93/15199, WO 93/15200 и WO 01/77137 и Европейский патент EP 413622. Дополнительно в контексте биспецифичных антител, описанных выше, специфичность антитела может быть подобрана таким образом, что один связывающий домен антитела связывается с ANGPTL4, тогда как второй связывающий домен антитела связывается с сывороточным альбумином, предпочтительно HSA.

Стратегии увеличения времени полужизни особенно полезны в случае нанотел, связывающих белков на основе фибронектина и других антител или белков, для которых желательно увеличение времени полужизни *in vivo*.

Конъюгаты антител.

Настоящее изобретение относится к антителам или их фрагментам, которые специфично связываются с белком ANGPTL4, рекомбинантно слитым или химически конъюгированным (включая ковалентную и нековалентную конъюгацию) с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, предпочтительно с полипептидом, имеющим по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот) с образованием слитых белков. В частности, настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанного в данном документе (например, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)2-фрагмент, VH-домен, VH CDR, VL-домен или VL CDR), и гетерологичный белок, полипептид или пептид. Способы слияния или конъюгации белков, полипептидов или пептидов с антителом или фрагментом антитела известны в данной области техники. См., например, патенты США № 5336603, 5622929, 5,359046, 5,349053, 5,447851 и 5112946, европейские патенты № EP 307434 и EP 367166, международные публикации № WO 96/04388 и WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol., 154:5590-5600; и Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:11337-11341.

Дополнительные слитые белки могут быть получены с помощью методов перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (совместно именуемых как "перетасовка ДНК"). Перетасовка ДНК может использоваться для изменения активности антител по изобретению или их фрагментов (например, до антител или их фрагментов с более высокой аффинностью и более низкой скоростью диссоциации). См., в общем патенты США № 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8:724-33; Narayana, 1998, Trends Biotechnol., 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol., 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques, 24(2):308-313 (полное содержание этих патентов и публикаций включено в данное описание путем ссылки). Антитела или их фрагменты либо кодируемые антитела или их фрагменты могут быть изменены посредством случайного мутагенеза с помощью "подверженной ошибкам" ПЦР, случайной вставки нуклеотидов или другими способами до рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, специфично связывающиеся с белком ANGPTL4, можно рекомбинировать с одним или несколькими компонентами, мотивами, секциями, частями, доменами, фрагментами и т.д. из одной или нескольких гетерологичных молекул.

Кроме того, антитела или их фрагменты могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. В предпочтительных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гекса-гистидиновый пептид, такой как тег, представленный в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259, Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), среди прочих векторов, многие из которых находятся в продаже. Как описано в Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:821-824, например, гекса-гистидин обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные теги, используемые для очистки, включают в себя, но не ограничиваются ими, гемагглютининовый ("HA") тег, который соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., 1984, Cell, 37:767), и "FLAG"-тег.

В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению или их фрагменты, конъюгированы с диагностическим или детектируемым агентом. Такие антитела могут быть полезны для мониторинга или прогнозирования начала, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания или расстройства в качестве части процедуры клинического тестирования, такой как определение эффективности конкретной терапии. Такие методы диагностики и обнаружения могут быть осуществлены путем связывания антитела с детектируемыми веществами, включая, но не ограничиваясь ими, различные ферменты, такие как, но не ограниченными ими, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как, но не ограниченные ими, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как, но не ограниченные ими, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеина, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, но не ограниченными ими, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, но не ограниченными ими, люцифераза, люциферин и

акворин; радиоактивные вещества, такие как, но не ограниченные ими, йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I и ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn и ^{117}Tm ; и металлы-позитронные эмиттеры с использованием различных методов позитронной томографии и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает использование антител или их фрагментов, конъюгированных с терапевтической молекулой. Антитело или его фрагмент могут быть конъюгированы с терапевтической молекулой, такой как цитотоксин, например цитостатический или разрушающий клетки агент, терапевтический агент или ион радиоактивного металла, например альфа-излучателя. Цитотоксин или цитотоксический агент включают любой агент, который является вредным для клеток.

Кроме того, антитело или его фрагмент могут быть конъюгированы с терапевтической молекулой или молекулой лекарственного средства, которая модифицирует данный биологический ответ. Терапевтические молекулы или молекулы лекарственного средства не должны сталкиваться как ограниченные классическими химическими терапевтическими агентами. Например, молекулой лекарственного средства может быть белок, пептид или полипептид, обладающие желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, холерный токсин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервной ткани, тромбоцитарный фактор роста, тканевый активатор плазминогена, апоптотический агент, антиангиогенный агент; или модификатор биологического ответа, такой как, например, лимфокин.

Кроме того, антитело может быть конъюгировано с терапевтическими молекулами, такими как ион радиоактивного металла, такого как альфа-эмиттеры, такие как ^{213}Bi , или макроциклические хелаторы, полезные для конъюгации ионов радиоактивного металла, включающих, но не ограниченных ими, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm с полипептидами. В некоторых вариантах осуществления макроциклическим хелатором является 1, 4, 7, 10-тетраазациклододекан-N, N', N'', N'''-тетрауксусная кислота (DOTA), которая может быть присоединена к антителу с помощью линкерной молекулы. Такие линкерные молекулы, как правило, известны в данной области и описаны в Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res.*, 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, *Bioconjug. Chem.*, 10(4):553-7; и Zimmerman et al., 1999, *Nucl. Med. Biol.*, 26(8):943-50, каждая из которых полностью включена путем ссылки.

Методы конъюгирования терапевтических молекул с антителами хорошо известны. См., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в *Controlled Drug Delivery* (2nd ed.), Robinson et al. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), p. 303-16 (Academic Press, 1985); и Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58.

Антитела могут быть также прикреплены к твердым носителям, которые особенно подходят для иммунологических анализов или очистки антигена-мишени. Такие твердые носители включают, но не ограничиваются ими, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Способы получения антител по изобретению.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела.

Изобретение относится по существу к очищенным молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, содержащие сегменты или домены цепей ANGPTL4-связывающих антител, описанных выше. Некоторые из нуклеиновых кислот по изобретению включают в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118 или 138, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128 или 148. В конкретном варианте осуществления, молекулами нуклеиновых кислот являются те, которые приведены в табл. 1. Некоторые другие молекулы нуклеиновых кислот по изобретению включают в себя нуклеотидные последовательности, которые являются по существу идентичными (например, по меньшей мере на 65, 80, 95 или 99%) с нуклеотидными последовательностями, приведенными в табл. 1.

При экспрессии с соответствующих экспрессионных векторов полипептиды, кодируемые этими полинуклеотидами, способны связывать антиген ANGPTL4.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, которые кодируют по меньшей мере одну CDR-область и обычно все три CDR-области из тяжелой или легкой цепей ANGPTL4-связывающего антитела, описанного выше. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют все или по существу все из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи ANGPTL4-связывающего антитела, описанного выше. Из-за вырожденности генетического кода каждую из аминокислотных по-

следовательностей иммуноглобулинов будет кодировать множество нуклеотидных последовательностей.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут кодировать обе переменную и константную области антитела. Некоторые из последовательностей нуклеиновых кислот по изобретению содержат нуклеотиды, кодирующие последовательность тяжелой цепи, которая по существу идентична (например, по меньшей мере на 80, 90 или 99%) последовательности тяжелой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120 и 140. Некоторые другие последовательности нуклеиновых кислот содержат нуклеотиды, кодирующие последовательность легкой цепи, которая по существу идентична (например, по меньшей мере на 80, 90 или 99%) последовательности легкой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130 и 150.

Полинуклеотидные последовательности могут быть получены путем *de novo* твердофазного синтеза ДНК или путем ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, описанных в приведенных ниже примерах), кодирующей ANGPTL4-связывающее антитело или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как фосфотриэфирный способ по Narang et al., 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90; фосфодиэфирный способ по Brown et al., *Meth. Enzymol.*, 68:109, 1979; диэтилфосфорамидитный способ по Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; и способ с использованием твердой подложки по патенту США № 4458066. Введение мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР может быть осуществлено, как описано, например, в *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (ed.), Freeman Press, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:967, 1991; и Eckert et al., *PCR Methods and Applications*, 1:17, 1991.

Настоящее изобретение также относится к экспрессионным векторам и клеткам-хозяевам для получения ANGPTL4-связывающих антител, описанных выше. Различные экспрессионные векторы могут быть использованы для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи ANGPTL4-связывающих антител или связывающие фрагменты. Как вирусные, так и невирусные экспрессионные векторы могут быть использованы для получения антител в клетке-хозяине из млекопитающих. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомальные векторы, как правило, с экспрессионной кассетой для экспрессии белка или РНК, а также искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al., *Nat. Genet.*, 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, подходящие для экспрессии ANGPTL4-связывающих полинуклеотидов и полипептидов в клетках млекопитающих (например, человека) включают pThioHis A, B & C, pCDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C (Invitrogen, San Diego, CA), векторы MPSV, а также многочисленные другие векторы, известные в данной области для экспрессии других белков. Подходящие вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, НВР вируса Эпштейна-Барра, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). См., Brent et al., выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.*, 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143, 1992.

Выбор экспрессионного вектора зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых вектор должен экспрессировать белок. Как правило, экспрессионные векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепи ANGPTL4-связывающего антитела или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления используется индуцируемый промотор для предупреждения экспрессии встроенных последовательностей за исключением индуцирующих условий. Индуцируемые промоторы включают, например, промотор арабинозы, LacZ, промотор металлотронеина или промотор белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут быть размножены в неиндуцирующих условиях без смещения клеточной популяции в направлении кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. Кроме промоторов, другие регулирующие элементы также могут быть необходимы или желательны для эффективной экспрессии цепей ANGPTL4-связывающего антитела или его фрагмента. Эти элементы, как правило, включают иницирующий ATG-кодон и прилегающий участок связывания рибосом или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии может быть повышена за счет включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.*, 20:125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Так, например, энхансер SV40 или энхансер CMV могут быть использованы для усиления экспрессии в клетках-хозяевах из млекопитающих.

Экспрессионные векторы могут также включать последовательность сигнала секреции для получения слитого белка с полипептидами, кодируемыми встроенными последовательностями ANGPTL4-связывающих антител. Чаще встроенные последовательности ANGPTL4-связывающих антител связаны с сигнальными последовательностями до включения в вектор. Векторы, которые будут использоваться для получения последовательностей, кодирующих переменные домены тяжелой и легкой цепей ANGPTL4-связывающих антител, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы обеспечивают возможность экспрессии переменных областей в виде слитых белков с константными областями, что в результате приводит к образованию интактных антител или их фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

Клетки-хозяева для включения и экспрессии цепей ANGPTL4-связывающих антител могут быть прокариотическими или эукариотическими. *E.coli* является одним из прокариотических хозяев, подходящих для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробные хозяева, подходящие для использования, включают бактерии, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах можно также экспрессировать векторы, которые обычно содержат контролирующие экспрессию последовательности, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку инициации репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество из множества хорошо известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая промоторная система (*trp*), бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Промоторы, как правило, контролируют экспрессию необязательно посредством операторной последовательности и имеют последовательности сайта связывания рибосом и т.п., для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также могут быть использованы для экспрессии ANGPTL4-связывающих полипептидов по изобретению. Также могут быть использованы клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления используются клетки-хозяева из млекопитающих для экспрессии и получения ANGPTL4-связывающих полипептидов по настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой либо линии гибридных клеток, экспрессирующих гены эндогенного иммуноглобулина (например, клон 1D6.C9 миеломной гибридомы, описанный в примерах), или клеточную линию млекопитающего, несущую экзогенный экспрессионный вектор (например, клетки миеломы SP2/0, приведенные в качестве примера ниже). Они включают в себя любую нормальную смертную или нормальную или аномальную бессмертную клетку животного или человека. Например, был создан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая клеточные линии CHO, различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клеточные линии миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культивирования клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов в общем описано, например, в Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., 1987. Экспрессионные векторы для клеток-хозяев из млекопитающих могут включать последовательности, контролирующие экспрессию, такие как сайт инициации репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen, et al., Immunol. Rev., 89:49-68, 1986), а также необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Эти экспрессионные векторы обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными для конкретного типа клеток, специфичными для конкретной стадии развития и/или модулируемыми или регулируемые. Подходящие промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотioneина, конститутивный основной поздний промотор аденовируса, дексаметазон-индуцируемый MMTV-промотор, промотор SV40, промотор MRP роIII, конститутивный MPSV-промотор, тетрациклин-индуцируемый CMV-промотор (такой, как немедленно ранний промотор CMV человека), конститутивный CMV-промотор и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области техники.

Способы введения экспрессионных векторов, содержащих полинуклеотидные последовательности, представляющие интерес, варьируют в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию с использованием хлорида кальция обычно используют для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев. (См. в общем Sambrook et al., выше). Другие способы включают в себя, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекции и микроинъекции, баллистические способы, виросомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатионов и нуклеиновых кислот, "голую" ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell, 88:223, 1997), усиленное агентом поглощение ДНК и трансдукцию *ex vivo*. В долгосрочной перспективе часто будет желательна продукция с высоким выходом рекомбинантного белка и стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют цепи ANGPTL4-связывающего антитела или связывающие фрагменты, могут быть получены с использованием экспрессионных векторов по изобретению, которые содержат вирусные сайты инициации репликации или эндогенные экспрессионные элементы и селективный маркерный ген. После введения вектора клеткам можно позволить расти в течение 1-2 дней на обогащенной среде перед переключением на селективную среду. Целью селективируемого маркера является придание устойчивости к селекции, и его присутствие позволяет рост клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективной среде. Устойчивые, стабильно трансфицированные клетки можно размножить с использованием методов культивирования тканей, подходящих к типу клеток.

Получение моноклональных антител по изобретению.

Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены различными методами, включая стандартные методики получения моноклональных антител, например стандартную методику гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495. Может использоваться множество методик

получения моноклональных антител, например вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов.

Животные системы для получения гибридом включают мышинные, крысиные и кроличьи системы. Получение гибридом в мышши является хорошо установленной процедурой. Протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Также известны партнеры для слияния (например, клеток мышшиной миеломы) и процедуры слияния.

Химерные или гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут быть получены на основе последовательности мышшиного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов, может быть получена из представляющей интерес мышшиной гибридомы и модифицирована, чтобы содержать последовательности неммышинных иммуноглобулинов (например, человека) с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышшиные вариабельные области могут быть связаны с человеческими константными областями с использованием способов, известных в данной области (см., например, патент США № 4816567 на имя Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела, мышшиные CDR-области могут быть вставлены в каркас антитела человека с использованием способов, известных в данной области техники. См., например, патент США № 5225539 на имя Winter, а также патенты США № 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370 на имя Queen et al.

В некотором варианте осуществления антитела по изобретению представляют собой гуманизированные антитела. Такие гуманизированные антитела, направленные против ANGPTL4, могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышшей, несущих части иммунной системы человека, а не иммунной системы мышши. Эти трансгенные и трансхромосомные мышши включают мышшей, называемых в данном документе мышшами HuMAb и мышшами KM соответственно, и упоминаются в данном документе как "мышши с Ig человека".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют непрерывные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой цепи к иммуноглобулина человека, вместе с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепи μ и κ (см., например, Lonberg, et al. (1994), *Nature*, 368(6474):856-859). Таким образом, данные мышши имеют сниженную экспрессию мышшинных IgM или κ и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека проходят переключение класса и соматические мутации с образованием высокоаффинных моноклональных IgGк челоока (Lonberg, N. et al., 1994, выше; обзор см. в Lonberg, N., 1994, *Handbook of Experimental Pharmacology*, 113:49-101; Lonberg, N., Huszar, D., 1995, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93; и Harding, F. and Lonberg, N., 1995, *Ann. N.Y., Acad. Sci.*, 764:536-546).

Получение и использование мышшей HuMAb и геномные модификации, которые несут такие мышши, дополнительно описаны в Taylor, L. et al., 1992, *Nucleic Acids Research.*, 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993, *International Immunology*, 5:647-656; Tuailleon et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:3720-3724; Choi et al., 1993, *Nature Genetics.*, 4:117-123; Chen, J. et al., 1993, *EMBO J.*, 12:821-830; Tuailleon et al., 1994, *J. Immunol.*, 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994, *International Immunology*, 579-591; и Fishwild, D. et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:845-851, содержание каждой из которых специально включено в данное описание посредством ссылки во всей полноте. Дополнительно см. патенты США № 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5789650, 5877397, 5661016, 5814318, 5874299 и 5770429, все на имя Lonberg и Kay; патент США № 5545807 на имя Surani et al.; публикации PCT № WO 92/03918, 93/12227, 94/25585, 97/13852, 98/24884 и 99/45962, все на имя Lonberg и Kay; и публикацию PCT № WO 01/14424 на имя Korman et al.

В другом варианте осуществления антитела человека по изобретению могут быть выработаны с использованием мышши, которая несет последовательности иммуноглобулинов человека на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышшь, которая несет трансгены тяжелых цепей антител человека и трансхромосому легких цепей антител человека. Такие мышши, называемые "мышшами KM", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 на имя Ishida et al.

Кроме того, в данной области доступны альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующих гены иммуноглобулина человека, и они могут быть использованы для выработки ANGPTL4-связывающих антител по изобретению. Например, может быть использована альтернативная трансгенная система, называемая Xenomouse (Abgenix, Inc.). Такие мышши описаны, например, в патентах США № 5939598, 6075181, 6114598, 6150584 и 6162963 на имя Kucherlapati et al.

Кроме того, альтернативные трансхромосомные системы животных, экспрессирующих гены иммуноглобулинов человека, доступны в данной области и могут быть использованы для индукции ANGPTL4-связывающих антител по изобретению. Например, могут быть использованы мышши, несущие как трансхромосому тяжелых цепей антител человека, так и трансхромосому легких цепей антител человека, называемые "ТС-мышшами"; такие мышши описаны в Tomizuka et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97:722-727. Кроме того, в данной области были описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепей антител человека (Kuroiwa et al., 2002, *Nature Biotechnology*, 20:889-894), и они могут быть использованы для выработки ANGPTL4-связывающих антител по изобретению.

Гуманизированные антитела по изобретению также могут быть получены с использованием спо-

собою фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека хорошо разработаны в данной области или описаны в приведенных ниже примерах. См., например, патенты США № 5223409, 5403484 и 5571698 на имя Ladner et al.; патенты США № 5427908 и 5580717 на имя Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197 на имя McCafferty et al.; и патенты США № 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 и 6593081 на имя Griffiths et al.

Гуманизированные антитела по изобретению также могут быть получены с использованием SCID-мышей, в которых иммунные клетки человека были восстановлены таким образом, что в ответ на иммунизацию могут вырабатываться антитела человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767 на имя Wilson et al.

Инженерия каркасных и Fc-областей.

Генно-инженерно модифицированные антитела по изобретению включают те, в которых были выполнены модификации в каркасных остатках в VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркаса выполняют для снижения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в "реверсивном мутировании" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки можно идентифицировать посредством сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой получено антитело. Для возвращения последовательностей каркасной области к ее зародышевой конфигурации, соматические мутации можно "реверсивно мутировать", восстанавливая последовательность зародышевой линии, с помощью, например, сайт-направленного мутагенеза. Предполагается, что такие прошедшие "реверсивный мутагенез" антитела также включены в объем настоящего изобретения.

Другой тип каркасных модификаций включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одной или нескольких CDR-областях для устранения T-клеточных эпитопов, чтобы тем самым уменьшить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называют "деиммунизацией", и он более подробно описан в патентной публикации США № 20030153043 на имя Carr et al.

В качестве дополнения или альтернативы модификациям, произведенным в каркасных или CDR-областях, антитела по настоящему изобретению могут быть сконструированы таким образом, чтобы включать модификации в Fc-области, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, как например времени полужизни в сыворотке, фиксации комплемента, связывания Fc-рецептора и/или антигензависимой клеточной цитотоксичности. Кроме того, антитело по настоящему изобретению может быть химически модифицировано (например, к антителу могут быть присоединены одна или несколько химических молекул), или оно может быть модифицировано для изменения своего гликозилирования, т.е. вновь для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже по тексту. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-нумерации Кабата.

В одном варианте осуществления шарнирную область CH1 модифицируют таким образом, что в этой области изменяется количество остатков цистеина, например увеличивается или уменьшается. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5677425 на имя Bodmer et al. Число цистеиновых остатков в шарнирной области CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления шарнирную область Fc антитела подвергают мутации для уменьшения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно одну или несколько мутаций аминокислот вводят в область поверхности взаимодействия доменов CH2-CH3 Fc-шарнирного фрагмента, так что антитело хуже связывает стафилококковый белок А (SpA) по сравнению со связыванием SpA природным Fc-шарнирным доменом. Этот подход более подробно описан в патенте США № 6165745 на имя Ward et al.

В другом варианте осуществления антитело модифицируют для увеличения времени его биологической полужизни. Возможны различные подходы. Например, могут быть введены одна или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США №6277375 на имя Ward. С другой стороны, для увеличения времени биологической полужизни антитело может быть модифицировано в CH1- или CL-областях для включения эпитопа, связывающего рецептор "спасения", взятого из двух петель CH2-домена Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 на имя Presta et al.

В других вариантах осуществления Fc-область изменяют путем замены хотя бы одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или несколько аминокислот могут быть заменены другими аминокислотными остатками, так что антитело приобретает измененное сродство к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторным лигандом, к которому изменяется сродство,

может быть, например, Fc-рецептор или компонент комплемента C1. Этот подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260 на имя Winter et al.

В другом примере одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что изменяется связывание антитела с C1q и/или снижается или ликвидируется комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Этот подход более подробно описан в патенте США № 6194551 на имя Idusogie et al.

В еще одном примере изменяют один или несколько аминокислотных остатков, изменяя тем самым способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход дополнительно описан в публикации PCT WO 94/29351 на имя Bodmer et al.

В еще одном примере Fc-область модифицируют для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или увеличивать сродство антитела к Fcγ-рецептору за счет модификации одного или нескольких аминокислотных остатков. Этот подход дополнительно описан в публикации PCT WO 00/42072 на имя Presta. Кроме того, было осуществлено картирование сайтов связывания на IgG1 человека для FcγR1, FcγR2, FcγR3 и FcRn и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R.L. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276:6591-6604).

В еще одном варианте осуществления модифицируют гликозилирование антитела. Например, может быть получено дегликозилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Гликозилирование может изменено, например, для увеличения сродства антитела к антигену. Такие модификации углеводного состава могут осуществляться, например, изменением одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно заменить один или нескольких аминокислотных остатков, что приводит к уничтожению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркаса переменных областей, тем самым устраняя гликозилирование по этому сайту. Такое дегликозилирование может увеличивать сродство антитела к антигену. Подобный подход описан более подробно в патентах США № 5714350 и 6350861 на имя Co et al.

В качестве дополнения или альтернативы может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, как например гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенное количество фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенное количество бисекторных структур GlcNac. Было показано, что такие измененные модели гликозилирования увеличивают ADCC-способность антител. Такие углеводные модификации могут быть выполнены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным комплексом механизмов гликозилирования. Клетки с измененным комплексом механизмов гликозилирования описаны в данной области и могут использоваться в качестве клеток-хозяев, в которых осуществляется экспрессия рекомбинантных антител по настоящему изобретению, для получения таким образом антитела с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 на имя Nanai et al. описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, гипофукозилированы. В публикации PCT WO 03/035835 на имя Presta описан вариант клеточной линии CHO, а именно клетки Lec 13, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, также приводящую к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 на имя Umana et al. описаны клеточные линии, созданные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в созданных клеточных линиях, имеют повышенное количество бисекторных структур GlcNac, что приводит к увеличению ADCC-активности антител (см. также Umana et al., 1999, Nat. Biotech., 17:176-180).

Способы конструирования измененных антител.

Как уже обсуждалось выше, ANGPTL4-связывающие антитела, имеющие последовательности VH и VL или последовательности полноразмерных тяжелой и легкой цепей, приведенные в данном документе, могут быть использованы для создания новых ANGPTL4-связывающих антител путем изменения последовательностей полноразмерных тяжелой цепи и/или легкой цепи, последовательности VH и/или VL или константных областей, присоединенных к ним. Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения, структурные признаки ANGPTL4-связывающего антитела по изобретению используются для создания структурно родственных ANGPTL4-связывающих антител, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител по изобретению, такое как связывание с ANGPTL4 человека и также ингибирование одного или нескольких функциональных свойств ANGPTL4 (например, ингибирование связывания ANGPTL4 с рецептором ANGPTL4, ингибирование ANGPTL4-зависимой пролиферации клеток).

Например, одна или несколько CDR-областей антител по настоящему изобретению или их мутанты могут быть объединены рекомбинантно с известными каркасными областями и/или другими CDR для создания дополнительных, рекомбинантно сконструированных, ANGPTL4-связывающих антител по изобретению, как обсуждалось выше. Другие типы модификаций включают в себя те, которые описаны в предыдущем разделе. Исходным материалом для способа конструирования является одна или несколько

из VH и/или VL-последовательностей, представленных в описании, или одна или несколько их CDR-областей. Для создания сконструированного антитела, необязательно фактически получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или несколько из VH и/или VL-последовательностей, представленных в описании, или одну или несколько их CDR-областей. Напротив, информацию, содержащуюся в последовательности(ях), используют в качестве исходного материала для создания последовательностей "второго поколения", полученных из исходных последовательностей, и затем последовательности "второго поколения" получают и экспрессируют в виде белка.

Соответственно, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения ANGPTL4-связывающего антитела, состоящего из последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112 и 132, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113 и 133, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114 и 134; и последовательности варибельной области легкой цепи антитела, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122 и 142, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123 и 143, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124 и 144; изменяющему по меньшей мере один аминокислотный остаток в последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела и/или последовательности варибельной области легкой цепи антитела, чтобы создать по меньшей мере одну измененную последовательность антитела; и экспрессирующему измененную последовательность антитела в виде белка.

Соответственно в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения ANGPTL4-связывающего антитела, состоящего из последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 35, 55, 75, 95, 115, и 135, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 36, 56, 76, 96, 116 и 136, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 37, 57, 77, 97, 117 и 137; и последовательности варибельной области легкой цепи антитела, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 45, 65, 85, 105, 125 и 145, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 46, 66, 86, 106, 126 и 146, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 47, 67, 87, 107, 127 и 147; изменяющему по меньшей мере один аминокислотный остаток в последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела и/или последовательности варибельной области легкой цепи антитела, чтобы создать по меньшей мере одну измененную последовательность антитела; и экспрессирующему измененную последовательность антитела в виде белка.

Соответственно в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения ANGPTL-связывающего антитела, оптимизированного для экспрессии в клетке млекопитающего, состоящего из: полноразмерной последовательности тяжелой цепи антитела, имеющей последовательность, выбранную из группы из SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120 и 140; и полноразмерной последовательности легкой цепи антитела, имеющей последовательность, выбранную из группы из SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130 и 150; изменяющему по меньшей мере один аминокислотный остаток в полноразмерной последовательности тяжелой цепи антитела и/или полноразмерной последовательности легкой цепи антитела, чтобы создать по меньшей мере одну измененную последовательность антитела; и экспрессирующему измененную последовательность антитела в виде белка. В одном варианте осуществления изменение тяжелой или легкой цепи происходит в каркасной области тяжелой или легкой цепи.

Измененная последовательность антитела также может быть получена с помощью скрининга библиотек антител, имеющих фиксированные последовательности CDR3 или минимальные необходимые связывающие детерминанты, как описано в US 2005/0255552, и разнообразие по последовательностям CDR1 и CDR2. Скрининг может быть выполнен в соответствии с любой скрининговой технологией, подходящей для скрининга антител из библиотек антител, такой как технология фагового дисплея.

Стандартные методы молекулярной биологии могут быть использованы для получения и экспрессии измененной последовательности антитела. Антитело, кодируемое измененной последовательностью (измененными последовательностями) антитела, представляет собой антитело, который сохраняет одну, некоторые или все из функциональных свойств ANGPTL4-связывающих антител, описанных в настоящем документе, функциональные свойства которых включают, но не ограничиваются ими, специфичное связывание с ANGPTL4 человека, яванского макака, крысы и/или мыши; и ингибирование антителом ANGPTL4-зависимой пролиферации клеток в F36E- и/или Va/F3-ANGPTL4R-анализе клеточной пролиферации.

В некоторых вариантах осуществления способов создания сконструированных антител по изобретению, мутации могут быть введены случайным образом или селективно на протяжении всей или части последовательности, кодирующей ANGPTL4-связывающее антитело, и полученные в результате модифицированные ANGPTL4-связывающие антитела могут быть подвергнуты скринингу на связывающую активность и/или другие функциональные свойства, как описано в настоящем документе. Способы мутагенеза описаны в данной области техники. Например, в публикации PCT WO 02/092780 на имя Short

описаны способы создания и скрининга мутантных антител с использованием насыщаемого мутагенеза, сборки лигированием синтетических фрагментов или их комбинации. В качестве альтернативы в публикации PCT WO 03/074679 на имя Lazar et al. описаны способы применения способов компьютерного скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела сконструированы, чтобы удалить участки дезамидирования. Известно, что дезамидирование вызывает структурные и функциональные изменения в пептиде или белке. Дезамидирование может привести к снижению биологической активности, а также к изменению фармакокинетических и антигенных свойств фармацевтического препарата белка. (Anal Chem., 2005 Mar 1, 77(5):1432-9).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела сконструированы для с повышения rI и улучшения их терапевтических свойств, rI белка является ключевым фактором, определяющим общие биофизических свойств молекулы. Антитела, имеющие низкую rI , как известно, являются менее растворимыми, менее стабильными и склонны к агрегации. Кроме того, очистка антител с низкой rI является сложной задачей и может быть проблематичной, особенно при масштабировании для клинического применения. Увеличение rI анти-ANGPTL4 антител или Fab-фрагментов по изобретению улучшило их растворимость, позволяя включать антитела в препараты в более высоких концентрациях (>100 мг/мл). Препараты антител с высокими концентрациями (например, >100 мг/мл) имеют преимущество в том, что обеспечивают возможность введения более высокие дозы антител в глаза пациентов посредством интравитреальных инъекций, что, в свою очередь, может снизить частоту введения, что представляет собой значительное преимущество при лечении хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые нарушения. Более высокая rI может также увеличить FcRn-опосредованный возврат в циркуляцию IgG-версии антитела, что таким образом позволяет препарату сохраняться в организме в течение более длительного периода времени, требуя меньшего количества инъекций. И, наконец, общая стабильность антител значительно улучшается за счет более высокой rI , обеспечивая более продолжительный срок хранения и сохранение биоактивности *in vivo*. Предпочтительной является rI выше или равная 8,2.

Функциональные свойства измененных антител можно оценить с помощью стандартных анализов, доступных в данной области и/или описанных в данном документе, например тех, которые указаны в примерах (например, методов твердофазного ИФА).

Профилактическое и терапевтическое применение.

Антитела, которые связывают ANGPTL4, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в терапевтически подходящей концентрации для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенными уровнями и/или активностью ANGPTL4, путем введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. Настоящее изобретение относится к способу лечения ANGPTL4-ассоциированных расстройств сердечно-сосудистой системы путем введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антител по изобретению. Настоящее изобретение относится к способу лечения ANGPTL4-ассоциированных расстройств сердечно-сосудистой системы путем введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антител по изобретению.

Антитела по изобретению могут быть использованы, в частности, для превентивного лечения, профилактики и для улучшения ANGPTL4-ассоциированных состояний или расстройств, включающих, но не ограниченных этим, любое количество состояний или заболеваний, при которых уровень белка ANGPTL4 является аномально высоким и/или при которых необходимо снижение уровня белка ANGPTL4. Эти состояния включают, но не ограничиваются ими, те, которые затрагивают липидный метаболизм, такие как гиперлипидемия, гиперлипопротеинемия и дислипидемия, включая атерогенную дислипидемию, диабетическую дислипидемию, гипертриглицеридемию (например, выраженную гипертриглицеридемию (например, с концентрацией триглицеридов в плазме >1000 мг/дл), связанную с ожирением гипертриглицеридемию и гипертриглицеридемию V типа), гиперхолестеринемию, хиломикронемия, смешанную дислипидемию (ожирение, метаболический синдром, диабет и т.д.), липодистрофию, липоатрофию и другие состояния, вызванные, например, снижением активности LPL и/или недостаточностью LPL, снижением активности LDL-рецепторов и/или недостаточностью LDL-рецепторов, измененным ApoC2, дефицитом ApoE, повышением ApoB, повышением продукции и/или снижением выведения липопротеинов очень низкой плотности (VLDL), определенной лекарственной терапией (например, дислипидемии, индуцированной лечением глюкокортикоидами), любой генетической предрасположенностью, диетой, образом жизни и т.п.

Другие ANGPTL4-ассоциированные заболевания или расстройства, связанные с или являющиеся результатом гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии и/или дислипидемии, включают в себя, но не ограничиваются ими, сердечно-сосудистые заболевания или нарушения, такие как атеросклероз, аневризма, гипертония, стенокардия, инсульт, цереброваскулярные заболевания, застойная сердечная недостаточность, заболевания коронарных артерий, инфаркт миокарда, заболевания периферических сосудов и т.п.; острый панкреатит; неалкогольный стеатогепатит (NASH); нарушения уровня сахара в крови, такие как диабет; ожирение и т.п.

Антитела по изобретению могут быть также использованы в комбинации с другими агентами для профилактики, лечения или улучшения связанных с ANGPTL4 заболеваний. Например, терапия статинами может быть использована в комбинации с анти-ANGPTL4 антителами и антигенсвязывающими фрагментами по изобретению для лечения пациентов нарушениями метаболизма триглицеридов.

Фармацевтические композиции.

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим ANGPTL4-связывающие антитела (интактные или связывающие фрагменты) в фармацевтическом препарате в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Композиции могут дополнительно содержать один или несколько других терапевтических агентов, пригодных для лечения или профилактики, например, сердечно-сосудистых заболеваний. Фармацевтически приемлемые носители усиливают или стабилизируют композицию, или они могут быть использованы для облегчения процесса получения композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми.

Фармацевтической композицией по настоящему изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области техники. Путь и/или способ введения изменяются в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительно, чтобы введение было интравитреальным, внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным или чтобы препарат вводился максимально близко к заданному участку. Фармацевтически приемлемый носитель должен быть пригодным для интравитреального, внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения действующее соединение, т.е. антитело, биспецифичная и полиспецифичная молекула, могут быть покрыты оболочкой из материала для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Композиция должна быть стерильной и жидкой. Требуемую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть осуществлено путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть изготовлены в соответствии со способами, хорошо известными и обычно практикуемыми в данной области. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливать в условиях GMP. Как правило, в фармацевтических композициях по настоящему изобретению используют терапевтически эффективную дозу или действующую дозу ANGPTL4-связывающего антитела. ANGPTL4-связывающие антитела изготавливают в виде фармацевтически приемлемых лекарственных форм традиционными способами, известными специалистам в данной области. Схемы введения подбирают так, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно вводить единичный болюс, можно вводить несколько дробных доз в течение какого-то времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно изготавливать парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов, подлежащего лечению; причем каждая единица содержит заданное количество действующего соединения, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

Фактические уровни доз действующих ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьировать таким образом, чтобы получить количество действующего ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, для конкретных композиции и способа введения, без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки зависит от ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее здоровье и предшествующая история болезни пациента, подлежащего лечению, а также другие факторы.

Врач или ветеринар может начать с доз антител по изобретению, используемых в фармацевтической композиции, на уровне ниже требуемого для достижения желаемого терапевтического эффекта и постепенно увеличивать дозировку, пока не будет достигнут желаемый эффект. В общем эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, описан-

ных в данном документе, варьируют в зависимости от множества различных факторов, включая пути введения, мишень, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные препараты, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Терапевтические дозировки должны подбираться с целью оптимизации безопасности и эффективности. При системном введении антитела дозировка варьирует от примерно 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 15 мг/кг массы тела хозяина. Для интравитреального введения антитела дозировка может варьировать от 0,1 до 5 мг/глаз. Например, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0 мг/мл. Пример схемы лечения включает системное введение один раз каждые две недели или раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев или по необходимости (PRN).

Антитело обычно вводят многократно. Интервалы между отдельными дозами могут быть недельными, месячными или годовыми. Интервалы также могут быть нерегулярными, определяемыми путем измерения уровня в крови ANGPTL4-связывающего антитела в организме пациента. Кроме того, альтернативные интервалы дозирования могут быть определены лечащим врачом и антитело может вводиться ежемесячно или по мере необходимости, чтобы быть эффективным. В некоторых способах системного введения дозировка корректируется для достижения концентрации антитела в плазме 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах 25-500 мкг/мл. В качестве альтернативы антитело можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, в случае чего требуется менее частое введение. Дозировка и частота введения варьируют в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. В целом гуманизированные антитела имеют более длительное время полужизни чем химерные антитела и антитела животных. Дозировка и частота приема могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом использовании вводят относительно низкие дозы с относительно нечастыми интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всей оставшейся жизни. При терапевтическом использовании иногда требуется введение относительно высоких доз через относительно короткие интервалы до тех пор, пока не замедляется или прекращается развитие заболевания и предпочтительно пока у пациента не наблюдается частичное или полное ослабление симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначена профилактическая схема.

Примеры

Нижеследующие примеры приведены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, но не ограничивают его объем. Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники и охвачены прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Получение очищенного рекомбинантного ANGPTL4 человека для использования в качестве антигена и в экспериментах по характеристике антител.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный полипептид ANGPTL4 человека (аминокислоты 26-406, соответствующие последовательности NM_139314.2 в NCBI) с N-концевым сигнальным пептидом из IgG-каппа человека (MKTFILLLVVLLLVIFLLPGATA) (SEQ ID NO: 152) и C-концевым FLAG-эпитопом (DYKDDDDKH) (SEQ ID NO: 153), гексагистидиновым тегом для очистки (HHHHHH) (SEQ ID NO: 154) и Avi-тегом (а именно последовательностью биотинилирования BirA, GGGLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 155), субклонировали в вектор для экспрессии в клетках млекопитающим, pRS5a, для создания плазмиды pRS-Ikk-hANGPTL4(26-406)-FLAG-6His-Avi, содержащий 20-аминокислотную сигнальную последовательность IKK, за которой следуют аминокислоты 26-406 ANGPTL4 человека с карбоксиконцевыми тегами Flag, 6His и Avi (табл. 2, SEQ ID NO: 156).

Для некоторых препаратов были использованы следующие процедуры для экспрессии, очистки и биотинилирования белка ANGPTL4 человека (способ 1). Адаптированные для роста в суспензии клетки HEK293T культивировали в бессывороточной экспрессионной среде Freestyle 293 (Life Technologies, кат. № 12338-018) и трансфицировали с использованием плазмиды pRS-Ikk-hANGPTL4(26-406)-FLAG-6His-Avi с помощью полиэтилениминового трансфекционного реагента (Polysciences, кат. № 23966). Через 5 ч после трансфекции в культуральную среду добавляли гепарин (Alfa Aesar, кат. № A16198) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Затем клетки культивировали в течение 72-96 ч, а затем собирали клеточный культуральный супернатант центрифугированием при 4°C и затем стерилизовали фильтрацией с использованием 0,22 мкм фильтра (Thermo, кат. № 567-0010). Профильтрованный клеточный культуральный супернатант затем концентрировали до примерно 100 мл путем фильтрации с тангенциальным потоком. Концентрированный супернатант разбавляли до объема 1 л в TBS-глицериновом буфере (50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 15%-ный глицерин, pH 7,4) и образец концентрировали до примерно 200 мл путем фильтрации с тангенциальным потоком. Затем к образцу добавляли смолу анти-Flag M2-агарозу (Sigma, кат. № 220102-177), предварительно уравновешенную в TBS-глицериновом буфере, и полученный раствор осторожно перемешивали в течение 1 ч при температуре 4°C. Агарозную смолу затем промывали 5 раз по 25 мл TBS-глицериновым буфером, и связавшийся белок ANGPTL4 элюировали 20 мл TBS-глицеринового буфера, содержащего 0,2 мг/мл пептида Flag (Sigma, кат. № 220176-317). Свободный от пероксида Tween-20 (AppliChem, кат. № A1284,0025) добавляли к раствору элюированного белка до

конечной концентрации 0,1% и полученный раствор наносили на 5-мл гепариновую колонку HiTrap (GE Lifesciences, кат. № 17-0407-01), которая была уравновешена в TBS-глицериновом буфере, содержащем 0,1% Tween-20 (буфер А). Колонку промывали 50 мл буфера А, а затем 50 мл буфера А, содержащего 300 мМ NaCl. Белок ANGPTL4 затем элюировали 20 мл буфера А, содержащего 600 мМ NaCl. Элюированный белок концентрировали с использованием центрифужного концентратора с молекулярной массой отсеки 30 кДа (Amicon Ultra, кат. № UFC903024). Чистота очищенного белка ANGPTL4, оцениваемая электрофорезом в ДСН-ПААГ, составляла >90%.

Для некоторых вариантов применения белки ANGPTL4 сайт-специфично биотинилировали по С-концевому Avi-тегу с использованием 10 мкг очищенного белка биотин-лигазы (BirA) (Avidity) на мкг ANGPTL4. В буфер добавляли до конечной концентрации 10 мМ АТФ, 10 мМ ацетат магния и 0,5 М D-биотин. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч при 30°C и затем в течение ночи при 4°C, а затем наносили на колонку HiLoad Superdex 200 (26×600 мм) (GE Lifesciences, кат. № 28-9893-36), которую уравновешивали в буфере А. Фракции, собранные с колонки Superdex 200, анализировали электрофорезом в ДСН-ПААГ, и содержащие ANGPTL4 фракции объединяли и концентрировали с использованием центрифужного концентратора.

Для других препаратов были использованы следующие процедуры для экспрессии, очистки и биотинилирования белка ANGPTL4 человека (способ 2). Плазмидой pRS-Ikk-hANGPTL4(26-406)C-Flag6HisAvi транзистентно трансфицировали клетки HEK293T с использованием стандартных способов трансфекции полиэтиленимином (PEI). Клетки размножали в суспензионной культуре в экспрессионной среде Freestyle 293 и трансфекцию проводили при конечной концентрации клеток 1×10^6 клеток/мл в 4 л среды с использованием 1-литровых флаконов. Через 5 ч после трансфекции добавляли гепарин до конечной концентрации 500 мкг/мл. Клетки выращивали при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием и супернатант пропускали через 0,22-мкм стерильный фильтр. Осветленный супернатант концентрировали и буфер заменяли на буфер В (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 10%-ный глицерин, 10 мМ имидазол, рН 7,4) с помощью фильтрации с тангенциальным потоком (ТFF). Концентрированный образец затем пропускали через 5-мл аффинную колонку Ni-NTA, уравновешенную буфером С (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 10%-ный глицерин, 10 мМ имидазол, 0,1%-ный н-октил-β-мальтозид, рН 7,4). После нанесения образца колонку промывали тем же буфером, пока не была достигнута базовая линия оптической плотности при 280 нм. Связавшийся белок ANGPTL4 затем элюировали градиентом имидазола (с 10 до 500 мМ). Элюированные фракции, содержащие ANGPTL4 человека, собирали, концентрировали с использованием концентратора Amicon (молекулярная масса отсеки 10 кДа), заменяли буфер с использованием колонки PD-10 на буфер для хранения (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 15%-ный глицерин, рН 7,4), аликвотили, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Чистота очищенного белка ANGPTL4, оцениваемая электрофорезом в ДСН-ПААГ, составляла >90%.

Для некоторых областей применения очищенный белок ANGPTL4, полученный, как описано выше, сайт-специфично биотинилировали следующим образом: очищенный белок в 50 мМ Bisine-буфере, рН 8,3, с конечной концентрацией приблизительно 1 мг/мл инкубировали в присутствии 10 мМ АТФ, 10 мМ ацетата магния, 0,1 мМ биотина и биотин-лигазы BirA (Avidity) при 30°C в течение 1 ч, а затем при температуре 4°C в течение ночи. Белок затем концентрировали с использованием концентратора Amicon (молекулярная масса отсеки 10 кДа), заменяли буфер с использованием колонки PD-10 на буфер для хранения (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 15%-ный глицерин, рН 7,4), аликвотили, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Пример 2. Получение очищенного рекомбинантного N-концевого биспирального домена белка ANGPTL4 человека для использования в экспериментах по характеристике антител.

Экспрессию, очистку и биотинилирование N-концевого биспирального домена ANGPTL4 человека (аминокислоты 26-161) проводили с использованием по существу тех же способов, что и описанные для полноразмерного ANGPTL4 человека в примере 1, способ 2. Последовательность очищенного N-концевого домена белка ANGPTL4 человека показана в табл. 2 (SEQ ID NO: 157).

Таблица 2

Аминокислотные последовательности ANGPTL4 человека (26-406)-FLAG-His6-Avi

Конструкция	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
ANGPTL4 человека (26-406)-FLAG-His6-Avi	156	<u>MKTFI</u> LLLWVLLLWVI <u>FLLPGATA</u> QPGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTGEGSTDLPLAPESRVDP EVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLSQSFGLLDH KHLDEHAVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRHLPRDCQELFQVGERQS GLFEIQPGSPFFLVNCKMTSDGGWTVIQRHHDGSDVFNRPWEAYKAGFG DPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTA YSLQLTAPVAGQLGATVVPFSGLSVFPSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGW WFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQKLKGGI FWKTWRGRYYPLQATMLIQP MAAEAASDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDI FEAQKIEWHE
ANGPTL4 человека (26-161)-FLAG-His6-Avi	157	<u>MKTFI</u> LLLWVLLLWVI <u>FLLPGATA</u> QPGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTGEGSTDLPLAPESRVDP EVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLSQSFGLLDH KHLDEHAVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRHLPRDYKDDDDKHHHHH HDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDI FEAQKIEWHE

Сигнальный пептид выделен подчеркиванием, а N-концевая QP-последовательность после сигнального пептида и C-концевые последовательности FLAG-His6-Avi выделены курсивом.

Пример 3. Получение и скрининг моноклональных антител.

Рекомбинантный белок ANGPTL4 человека был получен в лаборатории, как описано в примере 1, и был использован в качестве иммуногена для выработки клонов анти-ANGPTL4 гибридом. Bcl-2-трансгенных мышей иммунизировали рекомбинантным ANGPTL4 человека в соответствии со стандартным протоколом быстрой иммунизации. Гибридомы были получены с помощью стандартного способа электрослияния.

Клетки CHO-K1 PD, стабильно экспрессирующие ANGPTL4 человека, слитый с трансмембранным доменом, были получены с использованием стандартных способов. Из-за присутствия трансмембранного домена эти клетки представляют ANGPTL4 на своей поверхности. Таким образом, антитела, связывающие ANGPTL4 на поверхности этих клеток, могут быть обнаружены с помощью проточной цитометрии.

Супернатанты гибридомы скринировали путем обнаружения связывания антител, присутствующих в супернатанте, с ANGPTL4 человека, экспрессирующегося на поверхности клеток CHO-K1 PD. Связывание антител с клетками обнаруживали с использованием флуоресцентно меченого анти-мышинного вторичного антитела и проточной цитометрии. Родительские клетки CHO-K1 PD, которые не экспрессируют ANGPTL4, были использованы в качестве отрицательного контроля. Для получения гибридом, которые связываются с ANGPTL4, антитела очищали из клеточных супернатантов с использованием стандартных способов и полученный в результате обогащенный супернатант тестировали методом проточной цитометрии с клетками CHO-K1 PD/ANGPTL4 и родительскими клетками CHO-K1 PD.

Титры анти-ANGPTL4 антител в супернатантах гибридом были определены с помощью стандартного прямого твердофазного ИФА, в котором рекомбинантный белок ANGPTL4 человека иммобилизовали на поверхности планшета для твердофазного ИФА. Подтвержденные позитивные гибридомы субклонировали, а последовательности моноклональных антител, продуцируемых этими гибридомами определяли с использованием стандартных способов.

Впоследствии было показано, что моноклональные антитела 14P18, 17B1, 19C16 и 37P1 ингибируют опосредуемое ANGPTL4 человека ингибирование липопротеинлипазы человека с использованием способов, описанных в примере 7 ниже. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей 14P18, 17B1, 19C16 и 37P1 были определены с использованием стандартных способов.

Пример 4. Гуманизация моноклональных антител.

Процесс гуманизации хорошо описан в данной области (Jones et al., 1986, Queen et al., 1989, Riechmann et al., 1988, Verhoeven, Milstein and Winter, 1988). Термин "гуманизация" описывается как перенос антигенсвязывающего сайта антитела животного, например, полученного в мышце антитела в акцепторную каркасную область антитела человека, например, последовательность человеческой зародышевой линии (Retter et al., 2005). Главным основанием для гуманизации антитела является сведение к минимуму риска развития иммунного ответа на антитело, когда антитело вводят в качестве терапевтического средства человеку (Rebello et al., 1999).

Антигенсвязывающий сайт содержит определяющие комплементарной области (CDR) (Chothia and Lesk, 1987, Rabat et al., 1991) и позиции в каркасной области переменных доменов (VL и VH), которые прямо или косвенно влияют на связывание. Каркасные остатки, которые могут непосредственно влиять на связывание, могут, например, быть найдены в так называемой области "внешней" петли, расположенной между CDR2 и CDR3. Остатками, которые косвенно влияют на связывание, являются, например,

найденные в так называемых Верньерных зонах (Foote and Winter, 1992). Считается, что они поддерживают конформацию CDR. Эти позиции за пределами CDR принимаются во внимание при выборе подходящего акцепторного каркаса для минимизации числа отклонений конечного гуманизованного антитела относительно человеческой зародышевой акцепторной последовательности в каркасных областях.

Пример 5. Оптимизация последовательности и созревание аффинности антител.

Некоторые аминокислотные мотивы, как известно, подвергаются посттрансляционной модификации (PTM), такой как гликозилирование (например, NxS/T, где X обозначает любую аминокислоту, кроме P), окисление свободных остатков цистеина, дезамидирование (например, дезамидирование N в NG-последовательностей) или изомеризация (например, по DG-последовательностям). Если они присутствуют в областях CDR, то для повышения гомогенности продукта эти мотивы в идеале удалены с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Процесс созревания аффинности хорошо описан в данной области. Среди многих представляющих систем фаговый дисплей (Smith, 1985) и дисплей на эукариотических клетках, таких как дрожжи (Boder and Wittup, 1997), являются наиболее широко применяемыми системами отбора взаимодействия антител-антигенов. Преимуществом этих дисплеев является то, что они подходят для широкого спектра антигенов и можно легко регулировать строгость отбора. В фаговом дисплее могут быть представлены scFv- или Fab-фрагменты, а в дрожжевом дисплее могут быть представлены scFv, Fab или полнометражные IgG. Эти широко применяемые способы позволяют отбирать желаемые варианты антител из более крупных библиотек с разнообразием выше 1×10^7 . Библиотеки с меньшим разнообразием (например, 1000) могут быть скринированы с помощью микроэкспрессии и твердофазного ИФА (ELISA).

Ненаправленные или случайные библиотеки вариантов антител могут быть получены, например, с помощью подверженной ошибкам ПЦР (Cadwell and Joyce 1994) и обеспечивают очень простой, но иногда ограниченный подход. Другой стратегией является CDR-направленная диверсификация антител-кандидатов. Одна или несколько позиций в одной или нескольких CDR могут специально быть выбраны в качестве мишени с использованием, например, вырожденных олигонуклеотидов (Thompson et al., 1996), тринуклеотидного мутагенеза (TRIM) (Kayushin et al., 1996) или любого другого подхода, известного в данной области техники.

Пример 6. Экспрессия и очистка гуманизованных антител.

ДНК-последовательности, кодирующие гуманизованные домены VL и VH, были заказаны в GeneArt (Life Technologies, Inc., Regensburg, Germany), включая оптимизацию кодонов для Homo sapiens. Кодирующие последовательности доменов VL и VH субклонировали путем вырезания и вставки полученных из GeneArt векторов в экспрессионные векторы, подходящие для экспрессии и секреции в клетках млекопитающих. Тяжелые и легкие цепи были клонированы в отдельные экспрессионные векторы, чтобы обеспечить совместную трансфекцию. Элементы экспрессионного вектора включают промотор (цитомегаловирусный (CMV) энхансер-промотор), сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигналы полиаденилирования и терминации транскрипции (из гена бычьего гормона роста (BGH)), элемент, позволяющий эписомную репликацию и репликацию в прокариотах (например, точки инициации репликации SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы, обеспечивающие селекцию (ген устойчивости к ампициллину и зеоциновый маркер).

Клетки почки эмбриона человека, конститутивно экспрессирующие большой Т-антиген SV40 (HEK293-T, ATCC11268), являются одной из предпочтительных клеточных линий-хозяев для транзientной экспрессии гуманизованных и/или оптимизированных белков IgG. Трансфекция осуществляется с использованием PEI (полиэтиленимина, мол. вес. 25000, линейный, Polysciences, USA, кат. № 23966) в качестве реагента для трансфекции. Исходный раствор PEI готовят путем тщательного растворения 1 г PEI в 900 мл очищенной воды для культивирования клеток при комнатной температуре (RT). Для облегчения растворения раствор PEI подкисляют добавлением HCl до pH 3-5 с последующей нейтрализацией с помощью NaOH до конечного pH 7,05. И, наконец, объем доводят до 1 л и раствор фильтруют через 0,22-мкм фильтр, аликвотируют и замораживают при -80°C до дальнейшего использования. Клетки HEK 293T культивируют с использованием запатентованной Novartis бессывороточной культуральной среды для трансфекции и размножения клеток и бессывороточной культуральной среды ExCell VPRO (SAFC Biosciences, USA, кат. № 24561C) в качестве продуцирующей/питательной среды. Клетки, полученные для транзientной трансфекции, культивируют в суспензионной культуре. Для небольших масштабов трансфекции (<5л) клетки выращивают в встряхиваемых колбах Corning (Corning, Tewksbury, MA) на орбитальном шейкере (100-120 об/мин) в увлажненном инкубаторе при 5% CO₂ (флаконы для посева). Клетки в высеваемых культурах должны поддерживаться в экспоненциальной фазе роста (плотность клеток от 5×10^5 /мл и 3×10^6 /мл) и иметь жизнеспособность >90% для трансфекции. Для небольших масштабов трансфекций (<5 л) аликвоту клеток отбирают из высеваемой культуры и доводят до $1,4 \times 10^6$ клеток/мл в 36% конечного объема бессывороточной культуральной среды Novartis. Раствор ДНК (раствор 1:0,5 мг плазмиды для экспрессии тяжелой цепи и 0,5 мг плазмиды для экспрессии легкой цепи на 1 л трансфекции) получают путем разбавления ДНК до 1 мг/л (конечный объем) в 7% от конечного объема культуры с последующим осторожным перемешиванием. Для того чтобы предотвратить бактериальное

заражение, этот раствор фильтруют с помощью 0,22-мкм фильтра (например, Millipore Stericup). Затем 3 мг/л (конечный объем) раствора PEI также разводят в 7% конечного культурального объема и осторожно перемешивают (раствор 2). Оба раствора инкубируют в течение 5-10 мин при комнатной температуре (RT). После этого раствор 2 добавляют к раствору 1 при осторожном перемешивании и инкубируют в течение еще 5-15 мин при комнатной температуре. Трансфекционную смесь затем добавляют к клеткам и культивирование клеток продолжают в течение 4-6 ч. И, наконец, оставшиеся 50% от общего продуцирующего объема восполняются за счет добавления бессывороточной культуральной среды ExCell® VPRO.

Культуру собирают центрифугированием при 4500 об/мин в течение 20 мин при 4°C (Heraeus®, Multifuge 3SR, Thermo Scientific, Rockford, IL). Выделенный клеточный супернатант стерильно фильтруют через фильтр Stericup (0,22 мкм) и хранят при 4°C до дальнейшей обработки. Очистку проводили на хроматографической системе "АКТА 100 Explorer Air" при температуре 4°C в холодильном шкафу, используя свежестерилизованную (0,25 М NaOH) 5-мл колонку HiTrap с белком A MabSelect®SuRe. Колонку уравнивали 5 объемами колонки фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), а затем стерилизованный фильтрат наносили при скорости 4,0 мл/мин. Колонку промывали 13 объемами колонки PBS. Антитело затем элюировали 5 объемами колонки 50 мМ цитрата, 70 мМ NaCl, pH 3,2. Элюат собирали 3-мл фракциями и подводили до pH 7 с помощью 1 М Трис-HCl, pH 10. Содержащие антитело фракции объединяли и затем стерилизовали фильтрацией (Millipore Steriflip, 0,22 мкм), оптическую плотность при 280 нм измеряли с помощью спектрофотометра (NanoDrop ND-1000) и концентрацию белка вычисляли на основании OD 280 и молярного коэффициента экстинкции, который был рассчитан на основе последовательности белка. Элюат был протестирован на агрегацию с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием детектора многоугольного светорассеяния (SEC-MALS) и чистоту оценивали электрофорезом в геле (электрофорезом в ДСН-ПААГ), анализом на эндотоксины (LAL) и масс-спектрометрически (MS). Для второй стадии очистки при необходимости антитело после первой очистки наносили на свежестерилизованную (0,5 М NaOH) гель-фильтрационную колонку (Hi Load 16/60 Superdex 200, 120 мл, GE-Healthcare). Колонку уравнивали PBS и прогон осуществляли с буфером PBS при скорости потока 1 мл/мин. Элюат собирали в 1,2-мл фракциях. Содержащие антитело фракции объединяли и полученное очищенное антитело анализировали, как описано для первой стадии очистки.

С использованием способов, описанных выше, были получены, проэкспрессированы и очищены следующие гуманизированные антитела: NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG318, NEG318-LALA, NEG319, NEG313 и NEG315. Каркасная область и родительские антитела для этих гуманизированных антител приведены в табл. 3, а нуклеотидные и аминокислотные последовательности приведены в табл. 1. Все гуманизированные антитела были получены в виде антител IgG1 человека, за исключением NEG276-LALA и NEG318-LALA, которые были получены с использованием модифицированной Fc-области (IgG1-LALA человека), где последовательность Leu234-235 в тяжелой цепи заменена Ala234-235. Антитела IgG1-LALA человека, как известно, имеют сниженную эффекторную функцию антитела по сравнению с обычными антителами IgG1 человека.

Таблица 3

Гуманизированные анти-ANGPTL4 антитела по изобретению

Антитело	VH SEQ ID NO	VL SEQ ID NO	Каркасная область	Родительское антитело
NEG276	13	23	hIgG1/каппа	19C16
NEG276-LALA	13	23	hIgG1- LALA/каппа	19C16
NEG278	38	48	hIgG1/каппа	19C16
NEG310	58	68	hIgG1/каппа	17B1
NEG313	78	88	hIgG1/каппа	37P1
NEG315	98	108	hIgG1/каппа	37P1
NEG318	118	128	hIgG1/каппа	14P18
NEG319	138	148	hIgG1/каппа	14P18

Пример 7. Анализ на липопротеинлипазу человека.

Клетки НЕК 293Т, культивируемые в экспрессионной среде Freestyle (Invitrogen), трансфицировали плазмидой для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующей полипептид полноразмерной липо-

протеинлипазы (LPL) человека (соответствует последовательности NCBI NM 000237.2) с использованием стандартного полиэтилениминового способа трансфекции. Через 24 ч после трансфекции в культуральную среду добавляли гепарин до конечной концентрации 3 ед/мл с целью улучшения высвобождения секретируемого hLPL с поверхности клетки. Через 60 ч после трансфекции собирали культуральную среду, фильтровали через 0,2-мкм фильтр и добавляли глицерин до конечной концентрации 10% об./об. Полученный раствор наносили на 5-мл гепарин-сефарозную колонку HiTrap (GE), которая была предварительно уравновешена буфером А (50 мМ Трис-НСl, 200 мМ NaCl, 10% об./об. глицерина, pH 7,2). Колонку промывали буфером А и белок LPL человека затем элюировали ступенчатым градиентом 500 мМ NaCl, 1 М NaCl и 2М NaCl в буфере А. Наиболее чистая и каталитически активная LPL человек элюировалась в 2М NaCl. Аликвоты очищенной LPL человека мгновенно замораживали и хранили при -80°C до использования.

Нижеследующий протокол использовали для оценки способности антител по изобретению блокировать ингибирование ANGPTL4 липопротеинлипазы человека. 384-луночный планшет (Corning, кат. № 3573) и планшет для образцов (Greiner Bio-one, кат. № 781201) промывали 1%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA) (0,1 мл/лунку) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем планшеты дважды промывали 0,05%-ным раствором Tween-20.

Анти-ANGPTL4 антитело в 100 мМ HEPES, pH 7,0 (20 мг на лунку, серийные разбавления с конечной концентрации в анализе в диапазоне от 0,02 до 500 нМ) добавляли в планшет для образцов с последующим добавлением 20 мкл белка ANGPTL4 человека (конечная концентрация в анализе составляла 10 нМ) в буфере для анализа (100 мМ HEPES, 2 мМ МдСlг, pH 7,0) и планшет инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре при осторожном встряхивании. Затем добавляли липопротеинлипазу, разведенную в буфере для анализа (20 мкл), и планшет инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре при осторожном встряхивании.

Приготавливали смесь связывающих ферментов, содержащую ацил-коэнзим А-оксидазу (Sekisui Diagnostics, кат. № T-17), ацил-коэнзим А синтетазу (Sekisui Diagnostics, кат. № T-16) и пероксидазу хрена (Sekisui диагностика), АТФ (Sigma, кат. № А7699) и коэнзим А (MP Biomedicals, кат. № 100493) в буфере для анализа. В смесь связывающих ферментов добавляли каталаза-агарозные шарики (Sigma, кат. № C9284), полученную смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин при встряхивании и шарики каталаза-агарозы затем удаляли центрифугированием.

VLDL человека (Millipore, кат. № LP1) разводили в буфере для анализа, обрабатывали каталаза-агарозными шариками в течение 30 мин и шарики удаляли из раствора центрифугированием. Amplex Red (Invitrogen, кат. № А12222) в буфере для анализа добавляли до концентрации 33 мкМ.

К раствору в планшете для образцов, содержащему LPL, ANGPTL4 и анти-ANGPTL4 антитела, добавляли смесь связывающих ферментов (20 мкл) и 54 мкл полученного раствора переносили в планшет для анализа. Для инициации липопротеинлипазной реакции добавляли раствор VLDL/Amplex Red (18 мкл), и флуоресценцию резорурфина непрерывно контролировали в течение 30 мин с использованием мультилуночного планшетного флуориметра Envision (Perkin Elmer). Конечные концентрации в анализе составляли 9,4 нМ ANGPTL4, ~4 нМ липопротеинлипазы человека, 2,3 мкг/мл VLDL человека, 0,75 мМ АТФ, 90 мкМ кофермента А, 0,5 ед/мл АСО, 1,25 ед/мл АСS, 1,2 ед/мл HRP и 10 мкМ Amplex Red.

Данные по зависимости флуоресценции резорурфина от времени использовали для определения активности липопротеинлипазы (первичная скорость) для каждого образца. Контрольные образцы без LPL (фоновый контроль) или без ANGPTL4 или анти-ANGPTL4 антител (контроль активности LPL) использовали для нормализации активности фермента, которую выражали в виде процента от контрольной активности LPL. Данные по ферментативной активности при различных концентрациях анти-ANGPTL4 антитела наносили на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, и данные аппроксимировали для получения значения EC_{50} для опосредуемого анти-ANGPTL4 антителами увеличения активности фермента липопротеинлипазы. В этом анализе ANGPTL4 человека в концентрации 10 нМ, как правило, ингибирует активность LPL на 70-95%. Анти-ANGPTL4 антитела по изобретению дозозависимо обращали ингибирование LPL белком ANGPTL4. Результаты по EC_{50} в этом анализе представлены в табл. 4. Типовые данные для выбранных антител по изобретению показаны на фиг. 1.

Таблица 4

Анти-ANGPTL4 антитела по изобретению блокируют ингибирование липопротеинлипазы (LPL) белком ANGPTL4 человека

Антитело	ANGPTL4 человека, EC ₅₀ (нМ)
NEG276	0,6
NEG276-LALA	0,7
NEG278	0,7
NEG310	1,6
NEG313	3
NEG315	3
NEG318	1,4
NEG319	0,5

Пример 8. Получение белков ANGPTL4 яванского макака, мыши и крысы и ANGPTL3 человека для использования в характеристике антител.

Последовательность ANGPTL4 яванского макака была определена путем амплификации последовательности гена из кДНК-библиотеки печени яванского макака (Biochain, кат. № C1534149-Су, № партии B409051). Праймеры 5'-UT-Суно 5'-ATCCCCGCTCCCAGGCTAC-3' (SEQ ID NO: 158) и 3'-UT-суно 5'-CAGCAAGGAGTGAAG-CTCCATGCC-3' (SEQ ID NO: 159) были подобраны на основе 5'- и 3'-нетранслируемых областей кДНК ANGPTL4 человека (последовательность NM_139314.2 в NCBI). Очищенный через гель продукт ПЦР лигировали в pCR4-Blunt-TOPO (Life Technologies, кат. № K2875-40) и секвенировали. Клонированная кДНК ANGPTL4 яванского макака кодировала белок из 406 аминокислот с 95% гомологии с ANGPTL4 человека. Нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты 26-406 из ANGPTL4 яванского макака, субклонировали в вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, pRS5, получая плазмиду pRS-Ikk-суноANGPTL4(26-406)-FLAG-6HIS-Avi, которая имела 20-аминокислотную последовательность Ikk, аминокислоты 26-406 из ANGPTL4 яванского макака и карбоксиконцевые теги FLAG, 6HIS и Avi (SEQ ID NO: 160 в табл. 5).

Белок ANGPTL4 яванского макака (26-406)-FLAG-6HIS-Avi экспрессировали и очищали с использованием способов, аналогичных описанным для белка ANGPTL4 человека (26-406)-FLAG-6HIS-Avi в примере 1. Для некоторых областей применения, очищенный белок ANGPTL4 яванского макака сайт-специфично биотинилировали с использованием способа, аналогичного описанному для белка ANGPTL4 человека в примере 1. Чистота очищенного белка ANGPTL4 яванского макака, оцениваемая электрофорезом в ДСН-ПААГ, составляла >90%.

Белок ANGPTL4 яванского макака(26-161)-FLAG-6HIS-Avi был получен с использованием аналогичных способов.

Последовательность белка ANGPTL4 (26-161) яванского макака, кодируемая соответствующей экспрессионной конструкцией, показана в табл. 5 (SEQ ID NO: 161).

Экспрессию, очистку и биотинилирование мышинового ANGPTL4 (аминокислоты 26-410) и крысиного ANGPTL4 (аминокислоты 24-405) проводили с использованием по существу тех же способов, что и описанные для ANGPTL4 человека в примере 1, способ 2. Последовательности белков ANGPTL4 мыши и крысы, кодируемые соответствующими экспрессионными конструкциями, показаны в табл. 5 (SEQ ID NO: 162 и 163 соответственно). Чистота очищенных белков ANGPTL4 мыши и крысы, оцениваемая электрофорезом в ДСН-ПААГ, составляла >90%.

ANGPTL3 (SEQ ID NO: 5, табл. 1) представляет собой белок человека, близкородственный ANGPTL4. Для того чтобы оценить возможное связывание антител по изобретению с ANGPTL3, экспрессировали, очищали и биотинилировали белок ANGPTL3 человека (14-460)-FLAG-His-Avi (SEQ ID NO: 164, табл. 5) с использованием способов, аналогичных описанным для ANGPTL4 человека в примере 1, способ 2.

Таблица 5

Аминокислотные последовательности ANGPTL4 яванского макака (26-406)-FLAG-His6-Avi, мышинного ANGPTL4(26-410)-FLAG-His6-Avi, крысиного ANGPTL4(24-405)-FLAG-His6-Avi и ANGPTL3 человека (17-460)-FLAG-His-Avi

Конструкция	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
ANGPTL4 яванского макака (26-406) - FLAG-His6-Avi	160	<u>MKTFILLWVLLWVIFLLPGATAQ</u> PGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLNALERRLSACGSACQGTGEGSTALPLAPESRVDPPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQH LRIQRLQSQVGLLDPKHLDEVAKPARRRRPEMAQPVDSAHNASRLHRLPRDCQELFEDGERQSGLFETQPQGSPPFLVNCMTSDGGWTVIQRRHDGSDVDFNRPEAYKAGFGDPQGEFWLGLKGVHSITGDRNSRLAVQLQDWDGNAESLQFSVHLGGEDTAYSLQLETPVASQLGATTVPFSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQELKKGIFWKTRGRYYPLOATTMLIQPTAAEAASDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
ANGPTL4 яванского макака (26-161) - FLAG-His6-Avi	161	<u>MKTFILLWVLLWVIFLLPGATAQ</u> PGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLNALERRLSACGSACQGTGEGSTALPLAPESRVDPPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQH LRIQRLQSQVGLLDPKHLDEVAKPARRRRPEMAQPVDSAHNASRLHRLPRDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
Мышиный ANGPTL4 (26-410) - FLAG-His6-Avi	162	<u>MKTFILLWVLLWVIFLLPGATAQ</u> FRPAQPEPPRFASWDEMNLAAHGLLQLGHGLREHVERTRGQLGALERMAACGNACQGPCKGDAPFKDSEDRVPEGQTFETLQSLQTQLKAQNSKIQQLFQKVAQQQRYLSKQNLRIQNLQSQIDLLAPTHLDNGVDKTSRGKRLPKMTQLIGLTPNATHLHRPPRDCQELFQEGEGRHSGLFQIQPLGSPFFLVNCEMTSDGGWTVIQRRLNGSVDNFQSWEAYKDFGDPQGEFWLGLKMHSTGNRGSQAVQLQDWDGNAKLLQFFIHLGGEDTAYSLQLEPTANELGATNVS PNGLSLPFSTWDQDHLRGLDNC AKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFHSIPRQRQERKKGIFWKTRGRYYPLOATLLIQPMEATAASDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
Крысиный ANGPTL4 (24-405) - FLAG-His6-Avi	163	<u>MKTFILLWVLLWVIFLLPGATAQ</u> PQGRPAQPEPPRFASWDEMNLAAHGLLQLGHGLREHVERTRGQLGALERMAACGNACQGPCKGTDPKDRVPEGQAPETLQSLQTQLKAQNSKIQQLFQKVAQQQRYLSKQNLRIQNLQSQIDLLTPHLDNGVDKTSRGKRLPKMAQLIGLTPNATRLHRLPRDCQELFQEGEGRHSGLFQIQPLGSPFFLVNCEMTSDGGWTVIQRRLNGSVDNFQSWEAYKDFGDPQGEFWLGLKMHSTGDRGSQAVQLQDWDGNAKLLQFFIHLGGEDTAYSLQLEPTANELGATNVS PNGLSLPFSTWDQDHLRGLDNC AKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFHSIPRQRQERKKGIFWKTRGRYYPLOATLLIQPMEATAASDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
ANGPTL3 человека (17-460)	164	<u>MKTFILLWVLLWVIFLLPGATAQ</u> PSRIDQDNSSFDLSLSEPKS RFAMLLDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSSEIKEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLEEKILLQQKVYLEEQLTNLIQNQPETPEHPVTSKLT FVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTFFLQNLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSNYVLRILELDWKNKHIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

Сигнальные пептиды выделены подчеркиванием, а N-концевой QP-последовательность после сигнального пептида и C-концевые последовательности FLAG-His6-Avi выделены курсивом.

Пример 9. Характеристика специфичности связывания антител с помощью прямого твердофазного ИФА.

Прямой твердофазный ИФА проводили для характеристики специфичности связывания отобранных антител по изобретению. Анализ проводили следующим образом. 384-луночный покрытый стрептавидином планшет Meso Scale Discovery (MSD) блокировали путем инкубирования планшета с 50 мкл блокирующего буфера (PBS, pH 7,4, 5% вес/об. бычьего сывороточного альбумина) на лунку при 22°C в течение 1 ч с при постоянном встряхивании (600 об/мин). Затем блокированный MSD-планшет промывали 3 раза промывочным буфером (PBS, pH 7,4 и 0,05% об./об. Tween-20), используя устройство для промывки планшетов (BioTek). После промывки биотинилированные белки ANGPTL4 человека, разведен-

ные в буфере для анализа (PBS, pH 7,4, без CaCl₂ или MgCl₂, 0,5% вес/об. свободного от жирных кислот бычьего сывороточного альбумина и 0,02% об./об. Tween-20) иммобилизовали на поверхности путем инкубации при концентрации 1 нМ (15 мкл/лунку) при температуре 22°C в течение 1 ч: полноразмерный ANGPTL4 человека (hANGPTL4), биспиральный домен ANGPTL4 человека (hANGPTL4-CCD) и полноразмерный ANGPTL3 человека (hANGPTL3). Затем планшет промывали 3 раза, как было описано ранее. Антитело, разведенное до концентрации 1 нМ в буфере для анализа, затем вносили в MSD-планшет (по 15 мкл на лунку), и планшет инкубировали в течение 1 ч при температуре 22°C при постоянном встряхивании (600 об/мин). Связанные антитела детектировали путем добавления 15 мкл/лунку разведенного 1:500 Sulfo-меченого козьего антитела против IgG человека. Затем планшет инкубировали в течение 1 ч при постоянном встряхивании (600 об/мин). Планшеты промывали 3 раза, а затем добавляли по 15 мкл/лунку 1× MSD Read buffer T и планшет проявляли с использованием Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Данные переносили в Microsoft Excel для анализа и графики строили с использованием GraphPad Prism v6. Эти эксперименты показали, что все антитела по изобретению, протестированные в этом анализе, связываются с полноразмерным ANGPTL4 человека и с N-концевым доменом ANGPTL4 человека и не связываются с полноразмерным ANGPTL3 человека. Специфичное к ANGPTL3 эталонное антитело использовали в качестве положительного контроля для анализа связывания ANGPTL3 (фиг. 2).

Пример 10. Определение константы диссоциации антитела с помощью анализа равновесного титрования в растворе (SET-анализа).

SET-анализ проводили следующим образом. В полипропиленовом 96-луночном планшете смешивали постоянную концентрацию ANGPTL4 антитела (10 пМ) с различными концентрациями биотинилированного полноразмерного белка ANPGLT4 человека, яванского макака, мыши или крысы, или N-концевого домена белка ANGPTL4 человека (в 5-кратных серийных разведениях в диапазоне от 0,01 мкМ до 100 нМ) в SET-буфере (PBS, pH 7,4, без CaCl₂ или MgCl₂, 0,5% вес/об., бычьего сывороточного альбумина (свободного от жирных кислот) и 0,02% об./об. Tween-20). Конечный объем реакционной смеси составлял 80 мкл. Планшет запечатывали с помощью адгезивной пленки и инкубировали при 22°C в течение 14 ч при постоянном встряхивании (300 об/мин). За тот же период времени 384-луночный покрытый стрептавидином планшет Meso Scale Discovery (MSD) блокировали, инкубируя планшет с 50 мкл блокирующего буфера (PBS, pH 7,4, 5% вес/об. бычьего сывороточного альбумина) на лунку при температуре 4°C. Блокированный MSD-планшет 3 раза промывали буфером для промывки (PBS, pH 7,4 и 0,05% об./об. Tween-20), используя устройство для промывки планшетов (BioTek).

Биотинилированный белок ANGPTL4 (полноразмерный ANGPTL4 человека, яванского макака, мыши или крысы или N-концевой домен ANGPTL4 человека) (1 нМ, 15 мкл на лунку) иммобилизовали на поверхности лунок покрытого стрептавидином MSD-планшета путем инкубации при 22°C в течение 1 ч при постоянном встряхивании (600 об/мин). Затем планшет промывали 3 раза, как было описано ранее.

Реакции равновесного связывания (15 мкл/лунку) вносили в MSD-планшет с иммобилизованным ANGPTL4 и инкубировали в течение 20 мин при 22°C. Несвязанный материал удаляли путем 3-кратной промывки пластины промывочным буфером и захваченное антитело детектировали путем добавления 15 мкл на лунку разбавленного 1:500 Sulfo-меченого козьего антитела против IgG человека. Затем планшет инкубировали в течение 1 ч при постоянном встряхивании (600 об/мин). Планшеты промывали 3 раза, а затем добавляли по 15 мкл/лунку 1×MSD Read buffer T, и планшет проявляли с использованием Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Данные были переносили в Microsoft Excel для анализа, и графики строили с использованием GraphPad Prism v6. Значения K_D были определены путем аппроксимации данных к следующему уравнению:

$$Y = (B_{\max} / (C_{Ab}/2)) \times ((C_{Ab}/2) - (((((C_{Ag} + C_{Ab}) + K_D)/2) - (((((C_{Ag} + C_{Ab}) + K_D)^2/4) - (C_{Ag} \times C_{Ab}))^{0,5})^{0,5})^2) / (2 \times C_{Ab}))),$$

где B_{max} - это сигнал, когда в растворе отсутствует белок ANGPTL4,

C_{Ab} является постоянной концентрацией анти-ANGPTL4 антитела в растворе,

C_{Ag} представляет собой концентрацию ANGPTL4 в растворе, а

K_D является константой равновесной диссоциации.

Константы равновесной диссоциации, определенные с использованием этого способа, приведены в табл. 6.

Таблица 6
Константы диссоциации (K_D) для антител по изобретению, связывающихся с белками ANGPTL4, определенные методом анализа равновесного титрования в растворе (SET-анализом)

Антитело (IgG)	ANGPTL4 человека (26-406), K_D (pM)	ANGPTL4 яванского макака (26-406), K_D (pM)	ANGPTL4 крысы (24-405), K_D (pM)	ANGPTL4 мыши (26-410), K_D (pM)
NEG276	24	14	>500*	>500*
NEG276-LALA	8	7	>500*	>500*
NEG278	15	20	>500*	>500*
NEG310	21	22	>500*	>500*
NEG313	9	15	>500*	>500*
NEG315	12	21	>500*	>500*
NEG318	9	17	>500*	>500*
NEG319	16	8	>500*	>500*
Эталонное антитело*	17	4	517	194

* Сигнал связывания не был обнаружен при используемых условиях эксперимента, что указывает на значение $K_D > 500$ пМ. Значение K_D 517 пМ было определено для связывания анти-ANGPTL4 эталонного антитела с крысиным ANGPTL4.

Пример 11. Кинетика связывания антител и константы диссоциации, определяемые с помощью анализа кинетики связывания Octet.

Константы диссоциации (K_D) определяли для выбранных антител по изобретению с использованием анализа кинетики связывания Octet (ForteBio). 10X буфер для кинетического анализа ForteBio (ForteBio, кат. № 18-5032) разводили в 10 раз в DPBS (Life Technologies, кат. № 14190-136) и полученный раствор добавляли по 0,2 мл на лунку в 96-луночный планшет (Greiner, кат. № 65520). Стрептавидиновые сенсоры (ForteBio, кат. № 18-5020) погружали в раствор и выдерживали в течение не менее 10 мин при комнатной температуре. Во втором 96-луночном планшете (Greiner, кат. № 65520) датчики промывали в 1X буфере для кинетического анализа, а затем погружали в 200 мкл 25 нМ биотинилированного ANGPTL4 человека или биотинилированного эталонного белка (для вычитания фона) на 1000 с при комнатной температуре. Датчики затем промывали в 1X буфере для кинетического анализа в течение 120 с и погружали в 200 мкл анти-ANGPTL4 антитела, разведенного в 1X буфере для кинетического анализа до различных концентраций (серийными 2-кратными разведениями; наиболее высокие концентрации составляли 12,5 или 25 нМ; самые низкие концентрации колебались от 0,8 до 3,1 нМ; для каждого определения K_D использовали 4-6 различных концентраций антител), и взаимодействие с антителами контролировали в течение 480 с. Датчики затем переносили в лунку, содержащую 200 мкл 1X буфера для кинетического анализа, и диссоциацию антител контролировали в течение 1200 с. Скорректированные по фону кривые ассоциации и диссоциации глобально аппроксимировали с помощью Octet Software (ForteBio) для получения константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), которые, в свою очередь, использовали для расчета равновесной константы диссоциации (K_D). Полученные в результате данные для выбранных антител по изобретению представлены в табл. 7 и 8.

Таблица 7
Константы диссоциации (K_D) антител и ANGPTL4 человека (26-406), определенные в анализе кинетики связывания ForteBio

Антитело	ANGPTL4 человека (26-406)		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
NEG276	$3,4 \times 10^5$	$8,0 \times 10^{-6}$	23
NEG278	$3,0 \times 10^5$	$6,7 \times 10^{-7}$	$\leq 17^*$
NEG310	$2,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-5}$	25
NEG313	$2,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-5}$	40
NEG315	$2,8 \times 10^5$	$7,9 \times 10^{-6}$	29
NEG318	$2,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-5}$	45

NEG319	$2,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-5}$	36
--------	-------------------	----------------------	----

* Указывали верхний предел, потому что скорость диссоциации медленнее предела обнаружения, который составляет приблизительно $5 \times 10^{-6} \text{c}^{-1}$.

Таблица 8
Константы диссоциации (K_D) NEG276-LALA, определенные в анализе кинетики связывания ForteBio

Антитело	Белок ANGPTL4	k_a ($\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	Средняя K_D (pM)
NEG276-LALA	ANGPTL4 человека (26-406)	$4,1 \times 10^5$	$5,9 \times 10^{-6}$	14	13
		$3,6 \times 10^5$	$6,0 \times 10^{-6}$	17	
		$4,3 \times 10^5$	$4,9 \times 10^{-7}$	$\leq 12^*$	
		$6,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^{-6}$	10	
	ANGPTL4 яванского макака (26-406)	$3,6 \times 10^5$	$5,4 \times 10^{-6}$	15	15
		$3,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-6}$	$\leq 14^*$	
	Крысиный ANGPTL4 (24-405)	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	7470	6343
		$1,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-3}$	6030	
		$5,2 \times 10^4$	$2,8 \times 10^{-5}$	5530	
	Мышиный ANGPTL4 (26-410)	$3,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^{-3}$	8250	6200
		$4,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-3}$	4150	
	ANGPTL4 человека (26-161)	$2,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-6}$	$\leq 23^*$	38
		$1,8 \times 10^5$	$9,2 \times 10^{-6}$	52	
	ANGPTL4 яванского макака (26-161)	$2,7 \times 10^5$	$6,4 \times 10^{-6}$	24	56
$1,9 \times 10^5$		$1,7 \times 10^{-5}$	87		
ANGPTL3 человека (17-460)	--*	--*	$>6000^{**}$	$>6000^{**}$	
	--*	--*	$>6000^{**}$		

* Указывали верхний предел, потому что скорость диссоциации медленнее предела обнаружения, который составляет приблизительно $5 \times 10^{-6} \text{c}^{-1}$.

** Связывание не обнаруживалось при самой высокой протестированной концентрации антител, 25 нМ.

Пример 12. Картирование эпитопов с помощью водородно-дейтериевого обмена/масс-спектрометрии.

Водородно-дейтериевый обмен (HDx) в сочетании с масс-спектрометрией (MS) (Woods, 2001) использовали для картирования сайта связывания антител NEG276 и NEG318 в N-концевом домене ANGPTL4. В HDx, способные к обмену амидные водороды в белках, заменяются на дейтерий. Этот процесс чувствителен к белковой структуре/динамике и доступности растворителей и, следовательно, способен дать информацию о связывании лиганда. Целью этих экспериментов была идентификация эпитопов NEG276 и NEG318 на ANGPTL4.

Автоматизированные HDx/MS-эксперименты проводили с использованием способов, аналогичных описанным в литературе (Chalmers, 2006). Эксперименты проводились на платформе Waters HDx-MS, которая включает в себя автоматический пробоотборник LEAP, UPLC-систему nanoACQUITY и масс-спектрометр SYNAPT G2. Дейтериевый буфер, используемый для мечения каркасной цепи белка дейтерием, включает 50 мМ D-Трис-HCl (pH 7,4), 500 мМ NaCl, 15% глицерина и 0,1% n-октил- β -D-мальтозид; общий процент дейтерия в растворе составлял 82,5%. Для экспериментального мечения дейтерием ANGPTL4 человека (26-161) в отсутствие анти-ANGPTL4 антител, 300 пмоль ANGPTL4 человека (26-161) (1,3 мкл) разбавляли в 100 мкл дейтериевого буфера в охлажденной пробирке и инкубировали в течение 25 мин на ротаторе при 4°C. Реакцию мечения затем гасили 100 мкл охлажденного гасящего буфера на льду в течение 3 мин. Через 3 мин погашенный раствор впрыскивали в систему LC-MS для автоматизированного расщепления пепсином и пептидного анализа. Для экспериментов мечения дейтерием ANGPTL4 (26-161) человека в присутствии связанного анти-ANGPTL4 антитела 300 пмоль анти-

ANGPTL4 антитела сначала иммобилизовали на шариках Thermo Protein G Plus и сшивали с использованием дисукцинимидилсуберата (DSS). Для проведения экспериментов по мечению шарик с антителом (содержащие 300 пмоль антитела) инкубировали с 300 пмоль ANGPTL4 человека (26-161) в течение 30 мин при температуре 4°C. Через 30 мин шарик промывали 200 мкл Tris-буфера. Затем добавляли 200 мкл охлажденного дейтериевого буфера и комплекс инкубировали в течение 25 мин при температуре 4°C. Через 25 мин реакционную смесь гасили 125 мкл охлажденного гасящего буфера на льду в течение 2,5 мин. После откручивания образца в течение 30 с в центрифуге, погашенный раствор впрыскивали в систему LC-MS для автоматизированного расщепления пепсином и пептидного анализа.

Все измерения проводились с использованием как минимум трех аналитических повторов. Все эксперименты дейтериевого обмена гасили с использованием 0,5 М ТСЕР и 3 М мочевины (рН 2,5). После гашения обменный антиген расщепляли в потоке пепсином с использованием колонки Poroszyme с иммобилизованным пепсином (2,1×30 мм) при 12°C с последующим захватом на улавливающей колонке Waters Vanguard HSS T3. Пептиды элюировали с захватывающей колонки и разделяли на колонке Waters CSH C18 1×100 мм (при 1°C) при скорости потока 40 мкл/мин с использованием бинарного восьмиминутного градиента от 2 до 35% В (подвижная фаза А включала 99,9% воды и 0,1% муравьиной кислоты; подвижная фаза В включала 99,9% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты).

В этих экспериментах по дейтериообмену были обнаружены пептиды, охватывающие 87% последовательности N-концевого домена ANGPTL4. Обнаруженные пептиды и снижение включения дейтерия для каждого пептида указаны в табл. 9. Эксперимент HD×MS-картирования позволил идентифицировать три области N-концевого домена ANGPTL4, которые существенно защищались как NEG276, так и NEG318: аминокислоты 26-35 (G₂₆PVQSKSPRF₃₅) (SEQ ID NO: 165), аминокислоты 42-68 (N₄₂VLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA₆₈) (SEQ ID NO: 174) и аминокислоты 69-95 (L₆₉ERRLSACGSACQTEGSTDLPLAPES₉₅) (SEQ ID NO: 190). Наблюдение, что NEG276 и NEG318 защищают несколько областей N-концевого домена ANGPTL4 от включения дейтерия, согласуется с результатами линейного пептидного эпитопного картирования, которые предполагают, что NEG276 и NEG318 имеют конформационные, а не линейные эпитопы (см. пример 13).

Таблица 9

Влияние связывания NEG276 и NEG318 на включение дейтерия в ANGPTL4 человека (26-161)

Название пептида	Последовательность	SEQ ID NO	Снижение включения дейтерия (Дальтоны)	
			NEG276	NEG318
26-35	GPVQSKSPRF	165	1,1	1,2
28-38	VQSKSPRFASW	166	1,0	0,9
42-49	NVLAHGLL	167	<0,5	<0,5
42-51	NVLAHGLLQL	168	<0,5	<0,5
44-51	LAHGLLQL	169	<0,5	<0,5
42-54	NVLAHGLLQLGQG	170	0,8	0,8
42-55	NVLAHGLLQLGQGL	171	0,9	0,8
42-57	NVLAHGLLQLGQGLRE	172	0,9	0,9
42-66	NVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQL	173	1,2	1,6
42-68	NVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA	174	1,3	1,8
44-66	LAHGLLQLGQGLREHAERTRSQL	175	1,1	1,6
45-57	AHGLLQLGQGLRE	176	0,7	0,9
45-66	AHGLLQLGQGLREHAERTRSQL	177	1,0	1,5
49-66	LQLGQGLREHAERTRSQL	178	0,5	1,0
52-66	GQGLREHAERTRSQL	179	<0,5	0,9
69-102	LERRLSACGSACQTEGSTDLPLAPESRV DPEVL	180	1,4	1,9
76-102	CGSACQTEGSTDLPLAPESRVDPEVL	181	1,0	1,2
86-102	STDPLAPESRVDPEVL	182	1,1	1,1
96-102	RVDPEVL	183	<0,5	<0,5
103-109	HSLQTQL	184	0,5	0,5
110-119	KAQNSRIQQQL	185	<0,5	<0,5
110-135	KAQNSRIQQQLFHKVAQQQRHLEKQHL	186	<0,5	<0,5
120-135	FHKVAQQQRHLEKQHL	187	<0,5	<0,5
141-147	QSQFGLL	188	0,6	0,6
144-155	FGLLDHKHLDHE	189	<0,5	<0,5

Для каждого пептида, обнаруженного с помощью масс-спектрометрии, показано снижение включения дейтерия (в Дальтонах) для комплекса антитело/ANGPTL4 относительно одного ANGPTL4.

Пример 13. Картирование эпитопов путем связывания с линейными пептидами.

Исследовали способность отдельных антител по изобретению, а именно NEG276 и NEG318, связываться с линейными 15-аминокислотными пептидами, полученными из N-концевого биспирального домена ANGPTL4 человека. В общей сложности было синтезировано и очищено 43 пептида с использова-

нием стандартных способов; последовательности пептидов приведены в табл. 10. Эти пептиды иммобилизовали на поверхности стекла и оценивали способность NEG276 и NEG318 связываться с иммобилизованными пептидами с использованием экспериментальных способов, оптимизированных для линейного пептидного картирования эпитопов на JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany). Антитело, которое не связывается с ANGPTL4, использовали в качестве контроля неспецифичного связывания. В этих экспериментах не наблюдалось никакого специфичного связывания NEG276 или NEG318 с любым из этих 43 15-членных пептидов.

Таблица 10
Последовательности линейных пептидов из ANGPTL4, используемых для экспериментов по связыванию антител с пептидами

Пептид	Название (SEQ ID NO)	Пептид	Название (SEQ ID NO)
GPVQSKSPRFASWDE	P1 (191)	APESRVDPEVLHSLQ	P23 (213)
QSKSPRFASWDEMNV	P2 (192)	SRVDPEVLHSLQTQL	P24 (214)
SPRFASWDEMNVLAH	P3 (193)	DPEVLHSLQTQLKQAQ	P25 (215)
FASWDEMNVLAHGLL	P4 (194)	VLHSLQTQLKQAQNSR	P26 (216)
WDEMNVLAHGLLQLG	P5 (195)	SLQTQLKQAQNSRIQQ	P27 (217)
MNVLAHGLLQLGQGL	P6 (196)	TQLKQAQNSRIQQLFH	P28 (218)
LAHGLLQLGQGLREH	P7 (197)	KAQNSRIQQLFHKVA	P29 (219)
GLLQLGQGLREHAER	P8 (198)	NSRIQQLFHKVAQQQ	P30 (220)
QLGQGLREHAERTRS	P9 (199)	IQQLFHKVAQQQRHL	P31 (221)
QGLREHAERTRSQLS	P10 (200)	LFHKVAQQQRHLEKQ	P32 (222)
REHAERTRSQLSALE	P11 (201)	KVAQQQRHLEKQHRLR	P33 (223)
AERTRSQLSALERRL	P12 (202)	QQQRHLEKQHRLRIQH	P34 (224)
TRSQLSALERRLSAS	P13 (203)	RHLEKQHRLRIQHLSQS	P35 (225)
QLSALERRLSASGSA	P14 (204)	EKQHRLRIQHLSQSFG	P36 (226)
ALERRLSASGSASQG	P15 (205)	HLRIQHLSQSFGLLD	P37 (227)
RRLSASGSASQGTGEG	P16 (206)	IQHLSQSFGLLDHHK	P38 (228)
SASGSASQGTGEGSTD	P17 (207)	LQSFGLLDHHKHLDH	P39 (229)
GSASQGTGEGSTDPL	P18 (208)	QFGLLDHHKHLDEVA	P40 (230)
SQGTEGSTDLPLAPE	P19 (209)	LLDHHKHLDEVAKPA	P41 (231)
TEGSTDLPLAPESRV	P20 (210)	HKHLDEVAKPARRK	P42 (232)
STDPLAPESRVDPE	P21 (211)	KHLDEVAKPARRKR	P43 (233)
LPLAPESRVDPEVLH	P22 (212)		

Пример 14. влияние анти-ANGPTL4 антител по изобретению на концентрации триглицеридов в плазме у мышей, трансгенных по ANGPTL4 человека.

Конструкция для экспрессии трансгенного ANGPTL4 человека у мышей было создана путем введения кДНК-последовательности полноразмерного ANGPTL4 человека в полилинкерную область вектора pLIVLE6, который содержит промотор гена аполипопротеина E человека и его области регуляции экспрессии в печени. ANGPTL4-трансгенные мыши были получены из мышей C57BL/6J и размножены в Novartis (East Hanover, NJ). У трансгенных мышей обрезали хвост в возрасте 7 дней и из хвостов выделяли ДНК с использованием набора REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; кат. № XNATR). Трансген ANGPTL4 человека детектировали с помощью пар праймеров, мишенью которых являются вектор pLIVLE6 и кДНК ANGPTL4. Мышей содержали в клетках с жестким поддоном на стойке, оборудованной для автоматического обеспечения воды в неограниченном количестве, поддерживая на 12-часовом цикле свет/темнота (с 6 утра до 6 ч вечера), и кормили стандартным кормом для грызунов (Harlan-Teklad; Frederick, MD; кат. № 8604). Температуру в виварии поддерживали между 20-25°C при влажности 30-70%. Мышей содержали с однопометниками, и они получали пищу и воду в неограниченном количестве в течение исследования за исключением 4-часового голодания перед сбором образцов.

Животных не кормили в течение 4 ч и быстро анестезировали для подчелюстного отбора крови для измерения фоновой концентрации триглицеридов в плазме. Затем мышам вводили с помощью внутрибрюшинной инъекции (IP) 30 мг/кг антитела, разведенного в PBS (10 мл/кг инъекционного объема). Кровь отбирали после 4-часового голодания в дни 1, 2 и 5 после введения антитела для измерения триглицеридов в плазме и общей концентрации IgG человека. Кровь собирали в пробирки BD Microtainer с ЭДТА для сбора/выделения (Becton, Dickinson, and Company; Franklin Lakes, NJ, кат. № 365973). Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 20817×g и плазму переносили в 0,2-мл пробирки в стрипах Thermo (Thermo-Scientific; Pittsburg, PA; кат. № AB 0451), замораживали и хранили при -80°C.

Концентрации триглицеридов в плазме измеряли с помощью набора Triglyceride (GPO) Liquid Reagent (Pointe Scientific, Canton, MI, кат. № T7532-500). Кратко, 300 мкл реагента для анализа, предварительно прогретого до 37°C, добавляли к 5 мкл плазмы в прозрачный плоскодонный 96-луночный планшет (Thermo Scientific, кат. № 269620). Планшет встряхивали на шейкере в течение 30 с, а затем помещали в инкубатор при 37°C на 5 мин. После 20-секундного смешивания измеряли оптическую плотность при 500 нм с помощью планшетного фотометра Molecular Devices SPECTRAmax PLUS. Концентрации

триглицеридов рассчитывали с использованием калибровочной кривой, сгенерированной с использованием известных количеств стандарта триглицеридов (Pointe Scientific, кат. № T7531-STD).

Антитела NEG276 и NEG318, оба, снижали уровень триглицеридов в плазме при введении мышам, трансгенным по ANGPTL4 человека (фиг. 3).

Пример 15. Влияние введения одного из анти-ANGPTL4 антител по изобретению яванским макакам с ожирением, диабетом и гипертриглицеридемией.

Для оценки фармакокинетического профиля и фармакологических эффектов NEG276-LALA авторы разово вводили подкожно дозу 3 мг/кг четырем яванским макакам с гипертриглицеридемией. Обезьяны, используемые в данном исследовании, имели базальный уровень триглицеридов в плазме в диапазоне от 207 до 2438 мг/дл. В различные моменты времени в течение 5 недель после введения NEG276-LALA собирали образцы плазмы (образцы крови у животных собирали до утреннего кормления, но животные не голодали в течение ночи).

Общие концентрации в плазме NEG276-LALA определяли стандартными способами. Концентрация NEG276-LALA в плазме достигала своего среднего максимального значения (C_{max}) $15,536 \pm 2281$ нг/мл через 3 дня после введения дозы. На 21-й день после введения дозы средняя концентрация в NEG276-LALA плазме крови составляла 2663 нг/мл (фиг. 4).

Плазматические концентрации TG, общего холестерина, липопротеинов высокой плотности (HDL), общего аполипопротеина В (apoB) и аполипопротеина CIII (apoCIII) определяли с использованием коммерчески доступных аналитических наборов (TG: Triglyceride (GPO) Liquid Reagent set, Pointe Scientific, кат. 1 T7532-500; общий холестерин: Cholesterol Reagent Set, Pointe Scientific, кат. 1 C7510-500; HDL: Cholesterol Precipitating Reagent из ручного набора реагентов для HDL, Wako, кат. № 431-52501, общий ApoB: K-Assay Apo B, Kamiya Biomedical Company, кат. № KAI-004; ApoC-III: ApoC-III Assay Reagent, кат. № LP-3865).

Введение NEG276-LALA приводило к заметному снижению уровня триглицеридов в плазме (TG). Пик снижения TG в плазме наблюдался на 7-й день после введения дозы; в этот момент времени плазматические концентрации TG были на 58% ниже базовых уровней TG в плазме. После пикового снижения TG на 7-й день после введения дозы концентрации TG в плазме оставались сниженными более чем на 40% относительно исходных концентраций через 21 день после введения дозы, а затем вернулись к исходному уровню (фиг. 5). В дополнение к его влиянию на плазматическое содержание TG введение NEG276-LALA снижало в плазме концентрацию общего холестерина примерно на 30% относительно исходного уровня (фиг. 6) и увеличивало концентрацию HDL-холестерина более чем на 20% от исходного уровня в дни с 7-го по 21-й после введения (фиг. 7). Кроме того, приблизительно 30%-ное снижение плазматической концентрации общего apoB наблюдалось в дни с 7-го по 21-й после введения дозы (фиг. 8), и приблизительно 25%-е снижение плазматической концентрации apoC-III по сравнению с исходным уровнем наблюдалось в дни 7-го по 21-й (фиг. 9). Авторы также оценивали влияние введения NEG276-LALA на уровни липопротеин-ассоциированных триглицеридов и холестерина путем разделения компонентов липопротеинов с использованием стандартных методов эксклюзионной хроматографии. Сравнение данных профилей липопротеинов у образцов до введения (в день 0) и день 7 после введения дозы показало, что введение NEG276-LALA приводило к заметному снижению связанного с обогащенными триглицеридами липопротеинами (TRL) холестерина и концентраций триглицеридов (результаты от одной обезьяны показаны на фиг. 10 и 11).

Включение путем ссылки.

Все ссылки, приведенные в данном документе, включая патенты, патентные заявки, документы, текстовые книги и т.п., а также ссылки, приведенные в них, в той степени, в которой они еще не включены, таким образом включены в данный документ путем ссылки во всей своей полноте.

Эквиваленты.

Приведенные выше описание считается достаточным, чтобы дать возможность специалисту в данной области техники применить изобретение на практике. Приведенное выше описание и примеры подробно описывают определенные предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и описывают лучший вариант, предусмотренный авторами изобретения. Однако следует учитывать, что независимо от того, насколько подробно вышеизложенное описание и примеры могут быть описаны в тексте, изобретение может быть осуществлено на практике во многих вариантах и изобретение должно толковаться в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное анти-ANGPTL4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, отличающееся тем, что имеет

(i) определяющую комплементарность область (CDR) 1 переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7; CDR2 с SEQ ID NO: 8; и CDR3 с SEQ ID NO: 9; CDR1 переменной области легкой цепи с SEQ ID NO: 17; CDR2 с SEQ ID NO: 18; и CDR3 с SEQ ID NO: 19; или

(ii) CDR1 переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10; CDR2 с SEQ ID NO: 11; CDR3 с

SEQ ID NO: 12; и CDR1 варибельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 20; CDR2 с SEQ ID NO: 21; и CDR3 с SEQ ID NO: 22.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся варибельной областью тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 13, и варибельной областью легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 23.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся варибельной областью тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 13 и варибельной областью легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 23.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся тяжелой цепью с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 28, и легкой цепью с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, характеризующееся тяжелой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 28 и легкой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 25.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся тяжелой цепью с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15, и легкой цепью с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, характеризующееся тяжелой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 15 и легкой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 25.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которое представляет собой моноклональное антитело, гуманизованное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или scFv-фрагмент.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, которое имеет изотип IgG1 или IgG4.

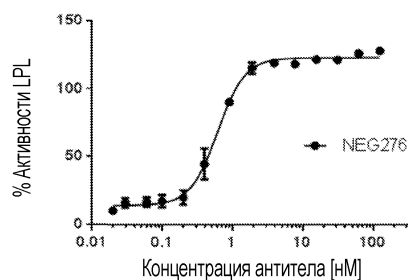
10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Способ лечения индивида с ANGPTL4-ассоциированным заболеванием, где индивиду вводят антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 или фармацевтическую композицию по п.10.

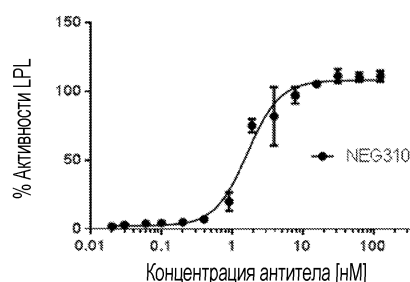
12. Способ по п.11, где заболевание представляет собой одно или несколько из следующих: тяжелая гипертриглицеридемия, гипертриглицеридемия, связанная с ожирением, гипертриглицеридемия типа V и хиломикронемия.

13. Способ по п.12, где тяжелая гипертриглицеридемия представляет собой тяжелую гипертриглицеридемию с концентрацией триглицеридов в плазме >500 мг/дл.

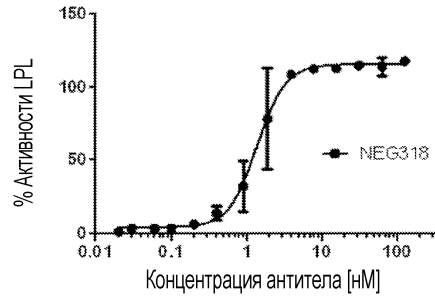
14. Способ по п.11, где заболевание представляет собой одно или несколько из следующих: первичная дислипидемия, метаболический синдром и диабет 2 типа.



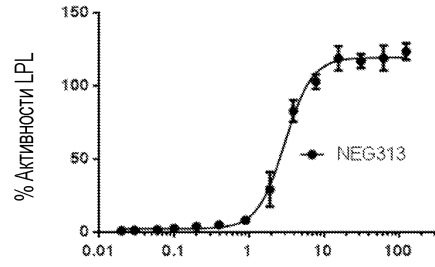
Фиг. 1А



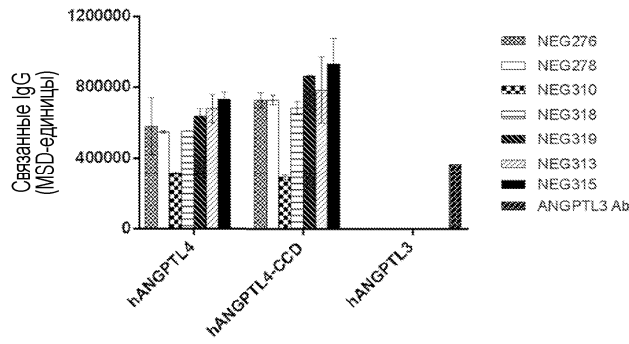
Фиг. 1В



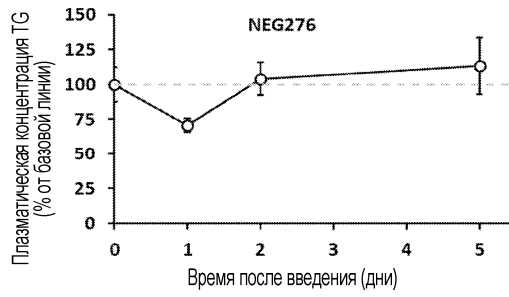
Фиг. 1С



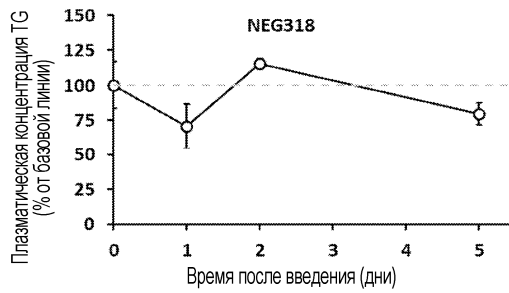
Фиг. 1D



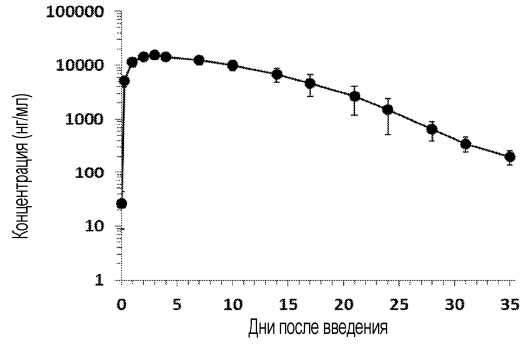
Фиг. 2



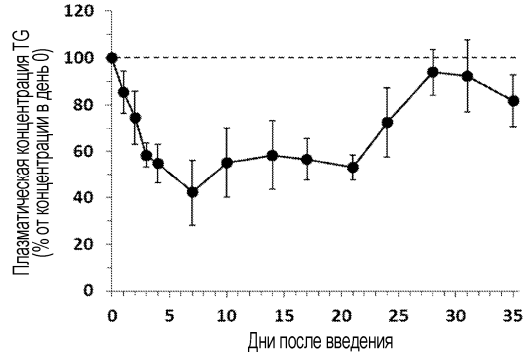
Фиг. 3А



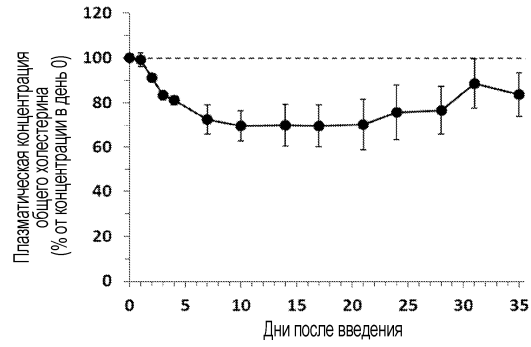
Фиг. 3В



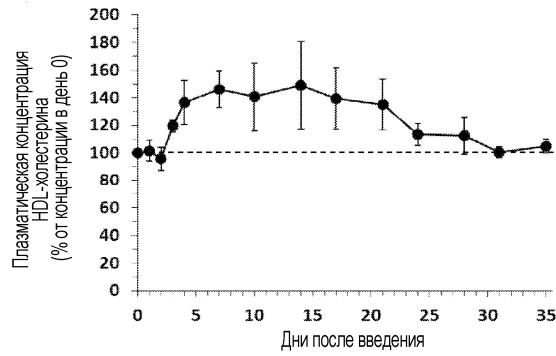
Фиг. 4



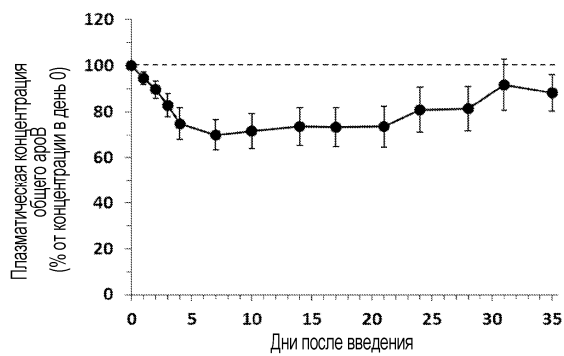
Фиг. 5



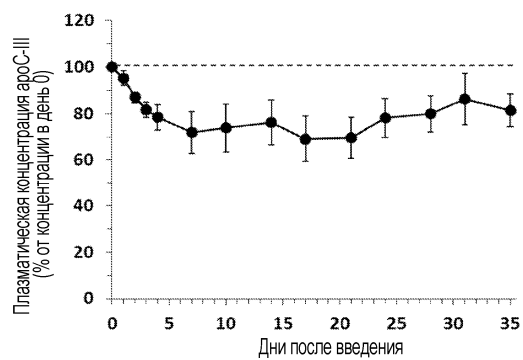
Фиг. 6



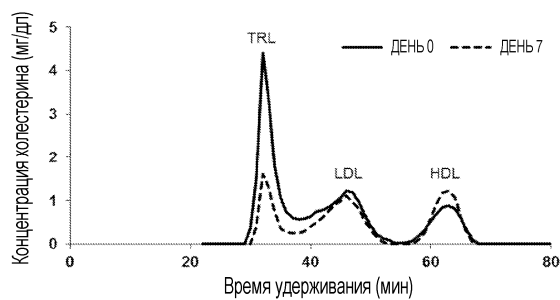
Фиг. 7



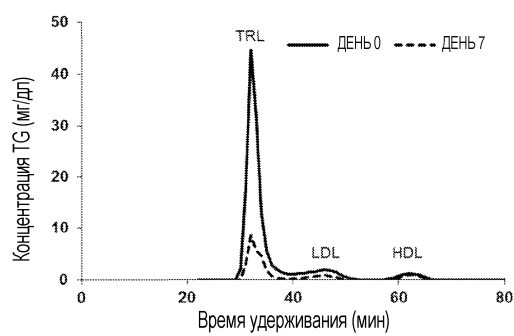
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

