

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044850**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.05

(21) Номер заявки
201992186

(22) Дата подачи заявки
2018.03.16

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К PAR2 И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/472,462; 62/637,766**

(32) **2017.03.16; 2018.03.02**

(33) **US**

(43) **2020.03.05**

(86) **PCT/EP2018/056776**

(87) **WO 2018/167322 2018.09.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Добсон Клер, Уилльямс Ричард,
Гаррелл Эн, Подичетти Садхана,
Фэирмен Дэвид, Торнтон Питер,
Ньютон Филип (GB)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2011031695**

T. IGAWA: "Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization.", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 28, no. 11, 28 November 2011 (2011-11-28), pages 1203-1207, XP055306183, DOI: 10.1038/nbt.1691, the whole document

IGAWA T. ET AL.: "pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS & PROTEOMICS, ELSEVIER, NETHERLANDS, vol. 1844, no. 11, 12 August 2014 (2014-08-12), pages 1943-1950, XP029050320, ISSN: 1570-9639, DOI: 10.1016/J.BBAPAP.2014.08.003, the whole document, page 1943, right-hand column, paragraph 3, page 1944, left-hand column, paragraph 2, page 1944, left-hand column, paragraph 3 - page 1945, left-hand column, paragraph 2, page 1946, right-hand column, paragraph 4 - page 1948, right-hand column, paragraph 1, page 1948, left-hand column, paragraph 3, page 1948, right-hand column, paragraph 2

PAULINE BONVIN ET AL.: "Purpose-Oriented Antibody Libraries Incorporating Tailored CDR3 Sequences", ANTIBODIES, vol. 4, no. 2, 20 May 2015 (2015-05-20), pages 103-122, XP055286766, DOI: 10.3390/antib4020103, abstract, page 110, paragraph 3 - page 113, paragraph 3 page 116, paragraph 2 - page 117, paragraph 5

WO-A2-2011111007

WO-A1-2014028354

WO-A1-2016000813

RUDI KOFF S. ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979, the whole document

(57) В изобретении предусмотрены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать PAR2. В некоторых вариантах осуществления антитела к PAR2 или их антигенсвязывающие фрагменты связывают PAR2 зависимым от pH образом. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы получения и применения антител и антигенсвязывающих фрагментов.

B1**044850****044850****B1**

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/472462, поданной 16 марта 2017 г., и согласно предварительной заявке на патент США № 62/637766, поданной 2 марта 2018 г.. Вышеупомянутые заявки включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 8 марта 2018 г., имеет название 1848081-0002-093-WO1_SL.txt, и ее размер составляет 351668 байтов.

Предпосылки изобретения

Хроническая боль является состоянием, которое может затронуть каждого и ложится тяжелым бременем на пациентов, системы здравоохранения и экономики. Примерно 100 млн человек в Соединенных Штатах Америки страдают от хронической боли, и согласно оценкам, суммарные ежегодные дополнительные затраты на медицинское обслуживание, требующее в связи с болью, включая медицинские затраты и экономические затраты, связанные с потерей времени и заработной платы, составляют от \$560 до \$635 миллиардов долларов (Институт медицины Национальных академий, 2011). Тем не менее, согласно опросу страдающих хронической болью, более половины считали, что они практически не контролируют или не контролируют свою боль (2006 Voices of Chronic Pain Survey, American Pain Foundation). Боль может быть вызвана различными состояниями и заболеваниями, от рака до диабета, артрита, и может быть разделена на следующие категории: ноцицептивная, нейропатическая и боль смешанного типа. Ноцицептивная боль определяется стимуляцией нервных волокон (например, тепловыми, механическими или химическими раздражителями), тогда как нейропатическая боль представляет собой боль, вызванную различными причинами, такими как повреждение нерва, заболевания и, что важно, воспаление. Воспаление, процесс, посредством которого организмы рекрутируют иммунные клетки и высвобождают иммунные факторы в место повреждения или инфекции, таким образом, может быть как полезным процессом восстановления повреждений, так и причиной боли.

Многие средства для лечения боли ингибируют воспаление. Двумя распространенными классами противовоспалительных болеутоляющих терапевтических средств являются стероидные противовоспалительные лекарственные средства и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID). Стероидные противовоспалительные лекарственные средства обычно подавляют простагландины и лейкотриены, продукты воспаления. Такие лекарственные средства являются надежными и эффективным, но влекут за собой риск серьезных побочных эффектов, включая, например, снижение плотности костной ткани, колебания веса, подавление иммунной системы и нарушения роста/полового созревания (Irving, P. M. et al. (2007) *Aliment Pharmacol Ther.* 26(3):313-329; Goodman et al. *J Am Acad Orthop Surg.* 2007 Aug;15(8):450-60). NSAID ингибируют циклооксигеназу 1 и/или 2 (COX-1 и/или COX-2), которые сами катализируют реакцию получения простагландинов из арахидоновой кислоты. Хроническая боль и воспаление могут требовать длительного лечения, а длительное ингибирование ферментов, представляющих собой COX, может привести к проблемам с желудочно-кишечным трактом, таким как желудочно-кишечное кровотечение и язвы. С учетом рисков, связанных с такими противовоспалительными средствами для лечения боли, существует потребность в альтернативных подходах к лечению боли.

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), представляют собой семейство мембранных белков, которые имеют общий структурный мотив из семи трансмембранных доменов, соединяющих N-концевой внеклеточный домен и C-концевой внутриклеточный домен (Granier et al., *Nat Chem Biol.* 2012 Aug; 8 (8): 670-673). GPCR воспринимают внеклеточные сигналы, такие как фотоны, гормоны, хемокины и т.д., и активируют внутриклеточные G-белки. Существует много семейств GPCR, таких как семейство рецепторов "Frizzled", семейство родопсина, семейство рецепторов секретина, семейство белков адгезии и семейство активируемого протеазой рецептора (PAR) (Zhang et al. *Nature.* 2012 Dec 20; 492(7429): 387-392; Zhang et al. *Mol Cells.* 2015 Oct; 38(10):836-42). Хотя различные семейства GPCR имеют общие структурные особенности, они обладают разными функциями, связываются с разными лигандами и активируются разными механизмами. Активацию семейства PAR GPCR связывали с воспалением и ноцицепцией (Gieseler et al. *Cell Commun Signal.* 2013; 11: 86).

Было идентифицировано четыре рецептора PAR: PAR1, PAR2, PAR3 и PAR4 (Macfarlane et al. *Pharmacol Rev.* 2001 Jun;53(2):245-82; Gieseler et al. *Cell Commun Signal.* 2013; 11: 86). Было показано, что активация PAR2 усиливает воспаление и ноцицепцию, что делает его ингибирование привлекательной мишенью противовоспалительных болеутоляющих терапевтических средств. PAR, в отличие от других GPCR, активируются путем протеолитического расщепления их внеклеточных доменов, что открывает N-концевую последовательность, которая действует в качестве привязанного активирующего лиганда. В частности, PAR2 расщепляется и активируется трипсином и триптазой.

Экспрессия PAR2 была обнаружена в васкуляризованных тканях, дыхательных путях, остеобластах, сердечно-сосудистой ткани, кератиноцитах, экзокринных железах, лейкоцитах, тучных клетках, кишечном эпителии, почке, нейронах, поджелудочной железе и различных типах гладких мышц (Macfar-

lane выше). PAR2 также участвует в развитии различных заболеваний или состояний, связанных с нейрогенным воспалением, ноцицепцией и передачей болевого сигнала. PAR2 может активироваться несколькими сериновыми протеазами, полученными от хозяина и патогена (например, трипсином, триптазой тучных клеток, тканевыми калликреинами или представителями каскада свертывания TF-FVIIa и FVa-FXa).

Было показано, что моноклональные антитела являются полезными в различных терапевтических применениях, и в настоящее время на рынке имеется множество терапевтических средств на основе антител (Maggon, *Curr Med Chem.* 2007;14(18):1978-87; Brekke and Sandlie, *Nat Rev Drug Discov* 2: 52-62, 2003). Наиболее распространенным типом антител, циркулирующих в кровотоке, является иммуноглобулин G (IgG). Применимость антитела IgG для терапевтических целей зависит от нескольких факторов, включая специфичность антитела к его мишени, силу его связывания с мишенью, а также то, насколько эффективно может продуцироваться антитело, и как быстро антитело выводится из сыворотки (время полужизни антитела в сыворотке крови). Значения времени полужизни антител в сыворотке крови часто регулируются с помощью FcRn (неонатального Fc-рецептора), который связывается с Fc-доменом иммуноглобулина G (IgG). *In vivo* IgG, как полагают, поглощаются неспецифически посредством пиноцитоза жидкой фазы (Pyzik et al, *J Immunol.* 2015 May 15;194(10):4595-603). Попав в эндосому, IgG связывается с FcRn, который распределяет IgG в эндосомы, осуществляющие рециклинг, и обратно на поверхность клетки, в направлении, противоположном лизосомам и противоположном разрушению. Хотя уровень рециклинга IgG, согласно оценкам, составляет 44% от уровня фракционного катаболизма, содержание терапевтических средств на основе антител все еще может истощаться в течение нескольких дней после введения (Kim, Jonghan, et al. *Clin. Immunol.* 122.2 (2007): 146-155).

Боль, связанная с воспалением, часто является хроническим состоянием. Сведение к минимуму дозировки и частоты введения терапевтической молекулы является желательным. Таким образом, существует потребность в новых противовоспалительных болеутоляющих средствах. Стандартные моноклональные антитела являются привлекательными кандидатами, но в некоторых случаях могут быть ограничены их значениями времени полужизни в сыворотке крови. По этой причине могут быть желательны альтернативные средства для лечения.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые связывают PAR2. Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы, помимо прочего, для ингибирования PAR2-опосредованной передачи сигнала и для лечения заболеваний и состояний, вызванных активностью PAR2 и/или передачей сигнала, опосредованной PAR2, или связанных с таковыми.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PAR2, содержащие переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит:

- i) VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13,
- ii) VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 818,
- iii) VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и при этом VL содержит:

- i) VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18,
- ii) VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19,
- iii) VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

Предпочтительно VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 831, и VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 17.

Предпочтительно VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 12, и VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 17.

Более предпочтительно VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 12, и VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 17.

В одном воплощении антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv или Fab'.

В другом воплощении антитело представляет собой моноклональное антитело.

В еще одном воплощении антитело представляет собой IgG.

В дополнительном воплощении VH кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 11, и/или VL кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 16.

В дополнительном воплощении антитело или антигенсвязывающий фрагмент предотвращает взаи-

модействие трипсина, триптазы и/или матриптазы с PAR2.

В дополнительном воплощении антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с PAR2 с большей аффинностью при pH 7,4, чем при pH 6,0.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению и содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 11.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению и содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 16.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен набор экспрессирующих векторов, содержащий: а) нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, как описано выше; и б) нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, как описано выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов, описанных выше, или набор векторов, описанный выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен фармацевтический набор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению или композицию по изобретению и один или несколько контейнеров.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения боли, проявляющейся при заболеваниях, при которых экспрессируется PAR2, у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению или композиции по изобретению.

Предпочтительно боль выбрана из группы, состоящей из ноцицептивной, нейропатической и боли смешанного типа.

Предпочтительно боль связана с головной болью, хронической головной болью, мигреновой головной болью, раком, вирусной инфекцией, ревматоидным артритом, остеоартритом, болезнью Крона, болезнью печени, рассеянным склерозом, повреждением спинного мозга, постгерпетической невралгией, диабетической нейропатией, болью в нижней части спины, воспалительным заболеванием сердца, заболеванием почки, гастритом, гингивитом, заболеванием пародонта, астмой, хронической обструктивной болезнью легких, аутоиммунным заболеванием, синдромом раздраженного кишечника, фибромиалгией, болями в ногах, синдромом беспокойных ног, диабетической нейропатией, аллергическим состоянием, хирургической процедурой, острым или хроническим физическим повреждением, переломом кости или повреждением раздавливанием, повреждением спинного мозга, воспалительным заболеванием, состоянием невоспалительной нейропатической или дисфункциональной боли или их комбинацией.

Более предпочтительно боль представляет собой боль при остеоартрите.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, предусматривающий стадии экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, или нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, в культивируемой клетке, и очистки антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Краткое описание графических материалов

Данный патент или поданная заявка на патент содержат по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии публикации данного патента или заявки на патент с цветным(и) графическим(и) материалом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

На фигурах 1A и 1B показаны таблицы, иллюстрирующие отличия последовательностей CDR2 (SEQ ID NOS 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504, 514, 524, 534, 544, 554, 564, 574, 584, 594, 604, 614, 624, 634, 644, 654, 664, 674, 684, 694, 704, 714, 724, 734, 744, 754, 764, 774, 784, и 794, соответственно, в порядке появления)

и CDR3 VH (SEQ ID NOS 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 525, 535, 545, 555, 565, 575, 585, 595, 605, 615, 625, 635, 645, 655, 665, 675, 685, 695, 705, 715, 725, 735, 745, 755, 765, 775, 785, и 795, соответственно, в порядке появления) различных клонов от таких же CDR Par0067. CDR1 и каркасные области являются одинаковыми для Par0067 и для всех из указанных клонов (т.е. Par0067 и каждый из клонов содержали последовательности под SEQ ID NO: 3 и 803-806).

На фиг. 2А и 2В показаны таблицы, иллюстрирующие отличия последовательностей CDR3 VL (SEQ ID NOS 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790 и 800, соответственно, в порядке появления) различных клонов от такой же CDR Par0067. CDR1, CDR2 и каркасные области являются одинаковыми для Par0067 и для всех из указанных клонов (т.е., клоны содержали последовательности под SEQ ID NO: 8, 9 и 807-810).

На фиг. 3 представлены данные по IC₅₀, полученные из анализа активности с использованием клеток с применением различных антител на основе IgG. Указаны типы клеток, которые применяли в каждом из клеточных анализов. N1 = не ингибирует.

На фиг. 4А представлены кривые IC₅₀ для РаВ670129 при противопоставлении трипсину в клетках линии А549 по отношению к агонистическим ответам на антитело при эквивалентных концентрациях. На фиг. 4В представлены кривые IC₅₀ для РаВ670129 при противопоставлении различным активаторам PAR2, представляющим собой протеазы.

На фиг. 5А-5F проиллюстрированы результаты экспериментов, в которых чувствительные нейроны или отличные от нейронов клетки дорсальных корешковых ганглиев (DRG) крысы обрабатывали матриптазой в присутствии или отсутствии РаВ670129 (также называемого в данном документе РаВ670129). Чувствительные нейроны DRG крысы, предварительно обработанные изотипическим контролем (20 нМ), демонстрируют индуцируемое матриптазой временное повышение уровней кальция (5А). Чувствительные нейроны, предварительно обработанные с помощью РаВ670129 IgG1ТМ (20 нМ), не отвечают на матриптазу (5В); количественная оценка в % нейронов, отвечающих на матриптазу, представлена на (5С). Отличные от нейронов клетки DRG, предварительно обработанные изотипическим контролем (20 нМ), также демонстрируют индуцируемое матриптазой временное повышение уровней кальция (8D), но отличные от нейронов клетки, предварительно обработанные с помощью РаВ670129 IgG1ТМ (20 нМ), - нет (5Е); количественная оценка в % отличных от нейронов клеток, отвечающих на матриптазу, представлена на (5F). На фигурах 5А-5Е раскрывается "LIGRLO" в виде SEQ ID NO: 832.

На фиг. 6 проиллюстрированы эффекты РаВ670129 (по сравнению с антителами к PAR1 или ворапаксаром) в отношении индуцированной тромбином активации PAR1 в клетках линии А549 человека.

На фиг. 7А изображен график, иллюстрирующий эффект различных средств для лечения (в том числе антитела к PAR2, представляющего собой Par0067) в отношении процентного значения соотношения гиперчувствительности, индуцируемой моноиодацетатом (MIA) на ипсилатеральной/контралатеральной стороне у крысы. На фиг. 7В изображен график, иллюстрирующий эффект различных доз РаВ670129 или антитела изотипического контроля в отношении процентного значения соотношения гиперчувствительности, индуцируемой с помощью MIA на ипсилатеральной/контралатеральной стороне у крысы, "в/в" означает внутривенный, и "п/о" означает "per os" (пероральный).

На фиг. 8 изображен график, иллюстрирующий эффект различных доз РаВ670129 или антитела изотипического контроля в отношении процентного значения соотношения гиперчувствительности, индуцируемой с помощью частичного лигирования периферического нерва на ипсилатеральной/контралатеральной стороне у мыши, "п/к" означает подкожный. N = 9-10 на группу. Данные анализировали с применением двухфакторного ANOVA с временем и лечением в качестве зависимых факторов. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Тьюки. При сравнении отдельных индивидов показаны * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 при сравнении с Опер. + изотипический контроль 10 мг/кг.

Подробное описание

Перед обращением к описанию настоящего изобретения следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничивается раскрываемыми конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует учитывать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена исключительно в целях описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту среднего уровня квалификации в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

Хотя при осуществлении или исследовании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, далее описываются предпочтительные способы и материалы.

А. Определения

Используемая в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа предусматривает определяемые объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Аминокислоты могут обозначаться в данном документе с помощью их общеизвестных трехбуквенных символов или с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Подобным образом, нуклеотиды могут обозначаться с помощью их общепринятых однобуквенных кодов.

Следует обратить внимание на то, что применяемое в данном документе "и/или" следует понимать как конкретное раскрытие каждого из данных двух указанных свойств или компонентов с другим или без другого. Например, "А и/или В" следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из (i) А, (ii) В, (iii) А и В, как если бы каждый из них был изложен в данном документе по отдельности.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо в отношении полимера из аминокислотных остатков. Термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и к полимеру из не встречающихся в природе аминокислот.

Выражения "активируемый протеазой рецептор 2", "PAR2" и т.п., как используется в данном документе, относятся к белку PAR2 человека, имеющему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 801, или его биологически активным фрагментам.

Термин "привязанный лиганд" относится к области N-концевой части PAR2, которая связывается с самим рецептором PAR2 и активирует его. В некоторых вариантах осуществления часть PAR2, представляющая собой привязанный лиганд, не становится доступной до тех пор, пока протеаза (например, тромбин или трипсин) не осуществит протеолитическое расщепление части фермента PAR2. В некоторых вариантах осуществления привязанный лиганд соответствует полипептиду, который на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 802.

Как используется в данном документе, "антитело, которое связывает PAR2", "антитело к PAR2" и т.п. включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают связанный с мембраной PAR2 или его фрагменты. В некоторых вариантах осуществления антитело к PAR2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с частью PAR2, представляющей собой привязанный лиганд.

В. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

Как используется в данном документе, "антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением" относятся к любому одному или нескольким из антител и антигенсвязывающих фрагментов, представленных в данном документе. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением содержат тяжелую цепь (VH), содержащую вариабельный домен тяжелой цепи, и легкую цепь (VL), содержащую вариабельный домен легкой цепи. VH-домен содержит три CDR, такие как любые из CDR, представленных в данном документе, и определенные или идентифицированные с помощью систем Chothia, Kabat или IMGT. Эти CDR обычно чередуются с каркасными областями (FR) и вместе составляют VH-домен. Подобным образом, VL содержит три CDR, такие как любые из CDR, представленных в данном документе, и определенные с помощью систем Chothia, Kabat или IMGT. Эти CDR обычно чередуются с каркасными областями (FR) и вместе составляют VL-домен. FR-области, такие как FR1, FR2, FR3 и/или FR4, подобным образом, могут быть определены или идентифицированы с помощью систем Chothia, Kabat или IMGT. По всей настоящей заявке, если указано, что CDR соответствуют системам Chothia, Kabat или IMGT, идентифицированы или определены с помощью этих систем, это означает, что CDR согласуются с этой системой (например, CDR по Chothia, CDR по Kabat или CDR по IMGT). Любой из данных терминов может быть использован для указания того, на какую из CDR, по Chothia, Kabat или IMGT, ссылаются.

Термин "антитело", как используется в данном документе, также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул, представляющих собой полные антитела. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., как используется в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным способом, синтетический или полученный способами генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул, представляющих собой полные антитела, с применением любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление, или методик генной инженерии на основе рекомбинации, предусматривающих манипуляцию с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна из,

например, коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, фаговых библиотек анти-тел) или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и осуществлять манипуляции с ней с помощью химических способов или с применением методик молекулярной биологии, например, для организации одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PAR2 с большей аффинностью при pH 7,4, чем при pH 6,0. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с PAR2 с по меньшей мере в 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз большей аффинностью при pH 7,4, чем при pH 6,0. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит i) VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 3 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; ii) VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 4 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; и iii) VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 5 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; и при этом VL содержит: i) VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8; но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 8 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; ii) VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 9 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; и iii) VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10; но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 10 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; при этом аминокислотные замены, делеции или вставки снижают аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PAR2 человека в не более чем 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10 или 5 раз по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2 и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7, при исследовании при pH 7,4 в анализе связывания PAR2. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, делеции или вставки включают гомологичную замену. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, вставок или делеций в CDR VH по сравнению с аминокислотными последовательностями CDR, присутствующими в последовательности под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, вставок или делеций в CDR VL по сравнению с аминокислотными последовательностями CDR, присутствующими в последовательности под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, вставок или делеций представляют собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен на гистидин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит: i) VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 13 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; ii) VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 14 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; и iii) VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 15 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; и при этом VL содержит i) VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 18 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; ii) VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 19 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; и iii) VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20; но при этом в последовательности под SEQ ID NO: 20 необязательно присутствуют 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, делеций или вставок; при этом аминокислотные замены, делеций или вставки снижают аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PAR2 человека в не более чем 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10 или 5 раз по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12 и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 17, при исследовании при pH 7,4 в анализе связывания PAR2. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, делеций или вставки включают гомологичную замену. В

некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, вставок или делеций в CDR VH по сравнению с аминокислотными последовательностями CDR, присутствующими в последовательности под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, вставок или делеций в CDR VL по сравнению с аминокислотными последовательностями CDR, присутствующими в последовательности под SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит: i) VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, ii) VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, iii) VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и при этом VL содержит: i) VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, ii) VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, iii) VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислотных замен, вставок или делеций представляют собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен на гистидин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH); где VH-домен содержит по меньшей мере одну, две или все три CDR (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под любым из SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, и 792. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH); где VH-домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под любым из SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, и 792. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH); где VH-домен содержит по меньшей мере одну, две или все три CDR (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 2 или 12. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH); при этом VL-домен содержит по меньшей мере одну, две или все три CDR (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под любым из SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, и 797. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH); при этом VL-домен содержит по меньшей мере одну, две или все три CDR (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под любым из SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, и 797. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH); при этом VL-домен содержит по меньшей мере одну, две или все три CDR (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 7 или 17. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH); где VH-домен

содержит CDR1, CDR2 и CDR3 (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под любым из SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, и 792,, и при этом VL-домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под любым из SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, и 797. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариативный домен легкой цепи (VL) и вариативный домен тяжелой цепи (VH); где VH-домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 2 или 12, и при этом VL-домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 (например, определенные с применением любой из систем - Chothia, IMGT или Kabat) с аминокислотной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 7 или 17.

После установления нуклеотидных последовательностей, кодирующих такие антитела, с помощью способов на основе рекомбинации можно получить химерные или гуманизированные антитела. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, вводят в клетки-хозяева и экспрессируют с применением материалов и процедур, общеизвестных из уровня техники и раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления VH кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под любым из SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791 и 833-841. В некоторых вариантах осуществления VH кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 или 11. В некоторых вариантах осуществления VL кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под любым из SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, и 796. В некоторых вариантах осуществления VL кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 6 или 16.

Настоящее изобретение включает антитела к PAR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают PAR2. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой нейтрализующее и/или блокирующее антитело или антигенсвязывающий фрагмент к PAR2. Термин "нейтрализующее" или "блокирующее" антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как используется в данном документе, относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, связывание которого с PAR2 (i) препятствует взаимодействию между PAR2 и протеазой (например, трипсином, триптазой и/или матриптазой); (ii) ингибирует расщепление PAR2 протеазой; (iii) ингибирует передачу сигнала, опосредованную PAR2, или активацию PAR2; и/или (iv) приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической функции PAR2. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением ингибируют активацию PAR2. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты ингибируют превращение неактивного, нерасщепленного PAR2 в активный, расщепленный PAR2. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты ингибируют воздействие на привязанный лиганд. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты ингибируют активацию рецептора PAR2 его привязанным лигандом. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты ингибируют связывание привязанного лиганда со вторым трансмембранным доменом PAR2. Ингибирование, вызванное нейтрализующим или блокирующим антителом к PAR2, не обязательно должно быть полным, при условии, что его можно выявить с применением соответствующего анализа. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность PAR2 по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с неингибированным активным PAR2. Некоторые примеры анализов для выявления ак-

тивности типичного антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2 = описаны в разделе "Примеры". Специалисту известны дополнительные виды анализов активности антитела к PAR2.

В конкретных вариантах осуществления любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, препятствует взаимодействию между PAR2 и протеазой. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой трипсин. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой нейтрофил-эластазу. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой нейтрофил-протеиназу 3. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой триптазу тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой тканевой фактор/фактор VIIa/фактор Ха. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой связанную с калликреином пептидазу. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой привязанную к мембране сериновую протеазу-1/матриптазу 1. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой цистеиновую протеиназу паразита. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты к PAR2 блокируют взаимодействие между PAR2 и протеазой (например, трипсином) *in vitro* со значением IC_{50} , составляющим менее чем приблизительно 15 нМ, определенным с помощью анализа связывания, такого как анализы, описанные в разделе "Примеры". В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением блокируют взаимодействие между PAR2 и протеазой (например, трипсином) *in vitro* при pH 7,4 со значением IC_{50} , составляющим менее чем приблизительно 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 400 пМ, 200 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 5 пМ, 1 пМ или 0,1 пМ. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением блокируют взаимодействие между PAR2 и протеазой (например, трипсином) *in vitro* при pH 6,0 со значением IC_{50} , составляющим более чем приблизительно 300 нМ, 500 нМ, 750 нМ, 1000 нМ, 1100 нМ или 1200 нМ. В определенных вариантах осуществления IC_{50} антитела к PAR2 или его фрагмента определяют в анализе конкуренции за эпитоп, таком как анализ конкуренции за эпитоп, описанный в разделе "Примеры", представленный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} антитела к PAR2 или его фрагмента определяют в анализе активности с использованием клеток. В некоторых вариантах осуществления в анализе активности с использованием клеток используют клетку человека (например, клетку линии A549), клетку крысы (например, клетку линии KNRK), клетку макака-крабоеда (например, клетку линии CYNOM-K1) или клетку мыши (например, клетку линии LL/2). В некоторых вариантах осуществления для анализа активности с использованием клеток применяют анализ притока кальция (например, анализ притока кальция, описанный в разделе "Примеры", представленном в данном документе). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует приток кальция в анализе притока кальция со значением IC_{50} , составляющим менее 1 нМ, 500 пМ, 400 пМ, 200 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ или 0,1 пМ. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты предупреждают аномальную активацию PAR2 трипсином. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты ингибируют/уменьшают индуцированную воспалением боль.

В конкретных вариантах осуществления любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, препятствуют взаимодействию между PAR2 и протеазой (например, трипсином). В некоторых вариантах осуществления антителам предупреждают связывание, расщепление и/или активацию PAR2 протеазой (например, трипсином). В настоящем изобретении предусмотрены антитела к PAR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают молекулы PAR2 с высокой аффинностью при физиологическом значении pH вне клетки (т.е. pH 7,4). В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают PAR2 при pH 7,4 (например, при 25 или 37°C) с K_D , составляющей менее чем приблизительно 5 нМ, 1 нМ, 900 пМ, 800 пМ, 700 пМ, 650 пМ, 600 пМ, 500 пМ, 200 пМ, 100 пМ или 50 пМ. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают PAR2 при слегка кислом значении pH (таким как pH 6,0) (например, при 25 или 37°C) с K_D , составляющей более чем приблизительно 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 15 нМ, 20 нМ, 25 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 80 нМ или 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления слегка кислым значением pH является значение pH эндосомального компартмента. В некоторых вариантах осуществления K_D можно определять согласно имеющимся на данный момент стандартным способам, таким как способы с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или микровесов на кристалле кварца (QCM).

Настоящее изобретение также включает антитела к PAR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PAR2 с периодом полудиссоциации ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 1,5 мин, 1,75 мин, 2 мин, 2,5 мин, 3 мин, 5 мин, 10 мин, 20 мин или 30 мин, определенным с применением анализа, такого как поверхностный плазмонный резонанс, при 25°C или 37°C при pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления антитела к PAR2 и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с PAR2 с периодом полудиссоциации ($t_{1/2}$), составляющим менее чем приблизительно 1 мин, 45 с, 30 с, 20 с, 15 с, 13 с, 7 с, 5 с или 3 с, определенным с применением анализа, такого как поверхностный плазмонный резонанс, при 25 или 37°C при слегка кислом значении pH (например, pH 6). В не-

которых вариантах осуществления слегка кислым значением pH является значение pH эндосомального компартмента. В некоторых вариантах осуществления K_D можно определять согласно имеющимся на данный момент стандартным способам, таким как способы с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или микровесов на кристалле кварца (QCM).

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением могут обладать одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител в соответствии с настоящим изобретением станут очевидны специалисту среднего уровня квалификации в данной области техники из обзора настоящего изобретения, в том числе раздела "Примеры", представленного в данном документе.

В отношении полипептидов термин "существенное сходство" или "существенно сходные" означает, что две пептидных последовательности при оптимальном выравнивании, таком как выравнивание с помощью программ GAP или BESTFIT с применением штрафов за открытие гэпа по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительны положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 консервативных аминокислотных замен по сравнению с последовательностью сравнения (например, любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 2, 7, 12 или 17). "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, если две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процентную идентичность последовательностей или степень сходства можно регулировать в сторону более высоких значений, чтобы сделать поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают группу аминокислот с (1) алифатическими боковыми цепями: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) с алифатически-гидроксильными боковыми цепями: серин и треонин; (3) с амидсодержащими боковыми цепями: аспарагин и глутамин; (4) с ароматическими боковыми цепями: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) с основными боковыми цепями: лизин, аргинин и гистидин; (6) с кислотными боковыми цепями: аспартат и глутамат и (7) с серосодержащими боковыми цепями, представляющими собой цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

В качестве альтернативы, консервативным замещением является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. "Умеренно консервативное" замещение означает любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

В зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов их тяжелых цепей антитела (иммуноглобулины) можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называют соответственно α , δ , ϵ , γ и μ . Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и в целом описаны, например в Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4-е изд. (W.B. Saunders, Co., 2000). Антитело может быть частью более крупной слитой молекулы, образованной с помощью ковалентной или нековалентной связи антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают следующие: (i) Fab-фрагменты; (ii) Fab'-фрагменты; (iii) F(ab')₂-фрагменты; (iv) Fd-фрагменты; (v) Fv-фрагменты; (vi) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vii) dAb-фрагменты и (viii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела верблюдовых, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), аднектины, иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как используется в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен (например, по меньшей мере один из VH или VL). Переменный домен может иметь любые размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая расположена рядом с одной или несколькими каркасными последовательностями или в той же рамке. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих VH-домен, связанный с VL-доменом, VH и VL-домены могут находиться друг относительно друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный VH- или VL-домен.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут находиться в антигенсвязывающем фрагменте антитела в соответствии с настоящим изобретением, включают: (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3 и (xiv) VL-CL. В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе в любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит глицин-сериновый линкер.

Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) переменных и константных доменов в любой из конфигураций, перечисленных выше, связанные друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными VH- или VL-доменами нековалентной связью (например, дисульфидной связью(связями)).

Как и молекулы, представляющие собой полные антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, в том числе форматы иллюстративных биспецифических антител, раскрытые в данном документе, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением с применением стандартных методик, доступных из уровня техники.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением являются антителами человека. Термин "антитело человека", как используется в данном документе, включает антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа человека. Антитела человека в соответствии с настоящим изобретением могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевого типа человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, а в некоторых вариантах осуществления в CDR3. Однако термин "антитело человека", как используется в данном документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением в некоторых вариантах осуществления могут представлять собой рекомбинантные антитела человека. Термин "рекомбинантное антитело человека", как используется в данном документе, включает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, такие как антитела, экспрессируемые с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые предусматривают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, при использовании животного, трансгенного в

отношении последовательностей Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, будучи полученными из последовательностей VH и VL человека зародышевого типа и родственными им, в природных условиях не могут находиться в зародышевом репертуаре антител человека *in vivo*.

Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарниров. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию массой примерно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе за счет межцепочечной дисульфидной связи между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связываются межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно сопряженных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы чрезвычайно сложно разделить даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы среди различных интактных изоформ IgG объясняется без ограничения структурными различиями, связанными с изоформой антитела в отношении шарнирной области. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG₄ человека может существенно уменьшить частоту появления второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира IgG₁ человека. В настоящем изобретении рассматриваются антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнире, СН2- или СН3-области, которые могут быть желательными, например, при получении для увеличения выхода желаемой формы антитела.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой выделенные антитела или выделенные антигенсвязывающие фрагменты. Термин "выделенное антитело" или "выделенный антигенсвязывающий фрагмент", как используется в данном документе, означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые были идентифицированы, отделены и/или извлечены по меньшей мере из одного компонента их естественного окружения. Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые были отделены или извлечены по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело встречается в природе или продуцируется в природных условиях, представляет собой "выделенное антитело" или "выделенный антигенсвязывающий фрагмент" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут по сути не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты к PAR2, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых антитела были получены. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR-областях были подвергнуты мутации с заменой на соответствующий(е) остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой антитело или антигенсвязывающий фрагмент были получены, или на соответствующий(е) остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или на аминокислоту, представляющую собой консервативную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности совместно называются в данном документе "мутациями зародышевой линии"). Рядовой специалист в данной области техники, исходя из последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все из остатков каркасных и/или CDR-областей в VH- и/или VL-доменах подвергаются обратной мутации с заменой на остатки, находящиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено. В других вариантах осуществления только некоторые остатки подвергаются обратной мутации с заменой на остатки исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутантные остатки, находящиеся в составе первых 8 аминокислот FR1 или в составе последних 8 аминокислот FR4, или только мутантные остатки, находящиеся в составе CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько остатков из каркасных и/или CDR-областей подвергаются мутации с заменой на соответствующий(е) остаток(и) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально получено антитело). В некоторых вариантах осуществления каркасная область 1 VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 803. В некоторых вариантах осуществления каркасная область 2 VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:

804. В некоторых вариантах осуществления каркасная область 3 VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 805. В некоторых вариантах осуществления каркасная область 4 VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 806. В некоторых вариантах осуществления каркасная область 1 VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 807. В некоторых вариантах осуществления каркасная область 2 VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 808. В некоторых вариантах осуществления каркасная область 3 VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 809. В некоторых вариантах осуществления каркасная область 4 VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 810. В некоторых вариантах осуществления каркасная область VH содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 консервативных замен по сравнению с последовательностью сравнения под любым из SEQ ID NO: 803-806. В некоторых вариантах осуществления каркасная область VL содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 консервативных замен по сравнению с последовательностью сравнения под любым из SEQ ID NO: 807-810.

Кроме того, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR-областях, например, при этом некоторые отдельные остатки подвергают мутации с заменой на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или подвергают мутации с заменой на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно с легкостью исследовать в отношении наличия одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретного случая), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим методом, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает антитела к PAR2, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей VH, VL и/или CDR, раскрытых в данном документе, содержащие одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела к PAR2, имеющие аминокислотные последовательности VH, VL и/или CDR с, например, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 консервативной аминокислотной заменой, относительно любой из аминокислотных последовательностей VH, VL и/или CDR, раскрытых в данном документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в варибельной области молекулы, представляющей собой антитело, известным как паратоп. Один антиген может содержать более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками на антигене и могут оказывать разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп образуется пространственно сближенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых случаях эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Следует отметить, что любая часть любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением может быть подобным образом модифицирована, например, с помощью эпитопной метки, компонента или компонентов, представляющих собой PEG, и т.п. Более того, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут содержать более одной эпитопной метки, например 2 эпитопные метки, или могут включать 0 эпитопных меток.

Термин "значительная степень идентичности" или "идентичные в значительной степени" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) наблюдается идентичность нуклеотидных последовательностей по по меньшей мере приблизительно 95% и более предпочтительно по по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, определенная с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, обсуждаемых ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся значительной степенью идентичности в отношении молекулы нуклеиновой кислоты сравнения, в некоторых случаях может кодировать полипептид с такой же или в значительной степени сходной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, коди-

руемый молекулой нуклеиновой кислоты сравнения.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно определяют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности с применением показателей сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для установления гомологии последовательностей или идентичности последовательностей близко родственных полипептидов, таких как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или белка дикого типа и его мутанта. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с применением FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и определение процентной идентичности последовательностей для областей наилучшего перекрытия для запрашиваемой последовательности и последовательности поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности в соответствии с настоящим изобретением с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402. В некоторых вариантах осуществления последовательности сравнивают с применением попарного выравнивания последовательностей EMBOSS Needle.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab'. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

С разработкой моноклональных антител антитела стали полезными и представляющими интерес в качестве фармацевтических средств. Моноклональные антитела получают любым способом, при котором молекулы, представляющие собой антитела, продуцируются непрерывными клеточными линиями в культуре. Примеры подходящих способов получения моноклональных антител включают способы с применением гибридом по Kohler et al. (1975, *Nature* 256:495-497) и способ с применением гибридомы В-клеток человека (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; и Brodeur et al., 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк), с. 51-63). Во многих случаях гибридомы применяют для создания исходного антитела, происходящего от мыши или грызуна. Это исходное антитело затем может быть модифицировано, например, с применением рекомбинантных методик, с получением вариантов, химерных антител, гуманизированных антител грызунов и т. п. Существуют другие способы получения исходного антитела, и такие способы известны из уровня техники. Однако независимо от способа, используемого для создания исходного антитела или даже варианта этого исходного антитела, любое данное антитело, происходящее от организма, отличного от человека, может быть затем модифицировано для повышения степени его гуманизированности.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены с применением комбинаторных библиотек для осуществления скрининга в отношении антител с желаемой активностью или активностями. Например, из уровня техники известен ряд способов для создания библиотек на основе фагового дисплея и скрининга таких библиотек на предмет антител, обладающих желаемыми характеристиками связывания. Такие способы описываются, в целом, в Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (под ред. O'Brien et al., Human Press, Тотова, Нью-Джерси, 2001). Например, один из способов получения представляющих интерес антител заключается в использовании фаговой библиотеки антител, как описано в Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340 (5): 1073-93.

В принципе, клоны синтетических антител отбирают путем скрининга фаговых библиотек, содержащих фаги, которые демонстрируют различные фрагменты варибельной области антитела (Fv), слитые с белком оболочки фага. Такие фаговые библиотеки сортируют с помощью аффинной хроматографии против желаемого антигена. Клоны, экспрессирующие Fv фрагменты, способные связываться с желаемым антигеном, адсорбируются на антигене и, таким образом, отделяются от несвязывающих клонов в библиотеке. Затем связывающие клоны элюируют с антигена и могут дополнительно обогащать с помощью дополнительных циклов адсорбции на антигене/ элюирования с антигена. Любое из антител в соответствии с настоящим изобретением может быть получено путем разработки подходящей процедуры скрининга по антигену для отбора представляющего интерес фагового клона с последующим конструированием клона полноразмерного антитела с применением последовательностей Fv из представляющего интерес фагового клона и подходящих последовательностей константной области (Fc), описанных в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, пятое издание, NIH Publication 91-3242, Бетесда, Мэриленд (1991), тома 1-3. Может быть целесообразным повысить степень гуманизированности антитела, не являющегося антителом человека, чтобы сделать его более подходящим для применения у субъек-

та, представляющего собой человека, и в клетках, будь то для диагностических, терапевтических или исследовательских целей. Антителам могут быть модифицированы для применения в качестве терапевтических средств. Примеры таких антител (в том числе фрагментов антител) включают химерные, гуманизированные и полностью человеческие антитела. В данной области техники существует множество способов для создания химерных, гуманизированных антител и антител человека. В контексте настоящего изобретения антитело считают гуманизированным, если по меньшей мере один из VH-домена или VL-домена является гуманизированным. Более того, VH- или VL-домен является гуманизированным, если аминокислотная последовательность по меньшей мере части по меньшей мере одной из FR-областей была модифицирована относительно исходного антитела, не представляющего собой антитело человека (например, антитела мыши), так чтобы аминокислотная последовательность этой части соответствовала части антитела человека или консенсусной последовательности человека. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна, две, три или четыре FR-области VH-домена и/или по меньшей мере одна, две, три или четыре FR-области VL-домена были модифицированы (целиком или частично), так чтобы их последовательность была в большей степени родственной последовательности человека. В свете всего вышеизложенного в определенных вариантах осуществления фрагмент гуманизированного антитела может быть представлен в контексте человеческой или не являющейся человеческой константной области легкой цепи и/или тяжелой цепи (например, содержащей CL и один или несколько из CH1, шарнира, CH2- и/или CH3-доменов). В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением представлены в контексте константных доменов легкой и/или тяжелой цепей человека, если таковые присутствуют. Антитела и связывающие фрагменты антител, в которых объединены любые из гуманизированных переменных доменов легкой цепи и/или переменных доменов тяжелой цепи, описанных в данном документе, являются иллюстративными антителами и антигенсвязывающими фрагментами в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является химерным. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является антителом или антигенсвязывающим фрагментом человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к PAR2, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к PAR2, содержащие мутацию в CH2- или CH3-области Fc-домена, где мутация(-и) повышает(-ют) аффинность Fc-домена по отношению к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к повышению значения времени полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, D297A). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена, а также другие мутации в переменных доменах антител, раскрытых в данном документе, охватываются объемом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления антитела содержат тройную мутацию L234F/L235E/P331S ("TM"). TM вызывает значительное уменьшение активности связывания молекул IgG1 человека с C1q, CD64, CD32A и CD16 человека. См., например, Oganessian et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64:700-704 (2008). Антитела с увеличенными значениями времени полужизни также могут быть получены при помощи модификации аминокислотных остатков, идентифицированных как вовлеченные во взаимодействие между Fc и FcRn-рецептором. Например, введение тройной мутации M252Y/S254T/T256E ('YTE') в CH2-домен молекул, представляющих собой иммуноглобулин G человека (IgG), вызывает повышение уровня их связывания с неонатальным Fc-рецептором человека (FcRn). См. патент США № 7083784, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления антитела содержат модификации YTE.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к PAR2, содержащие одну или несколько мутаций в VH- и/или VL-доменах, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с PAR2, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к PAR2, содержащие мутацию в CDR2- (SEQ ID NO: 4) или CDR3-области (SEQ ID NO: 5) VH-домена и/или CDR3 (SEQ ID NO: 10) VL-

домена, при этом в результате мутации(-ий) происходит замещение одной или нескольких аминокислот на гистидин и снижение аффинности VH- и/или VL-домена по отношению к PAR2 в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к повышению значения времени полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций VH включают, например, модификацию в положениях аминокислот 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16 и 17 CDR2 (SEQ ID NO: 4) и 1, 2, 4, 5 и 7 CDR3 (SEQ ID NO: 5). Неограничивающие примеры таких модификаций VL включают, например, модификацию в положениях 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 и 14 CDR3 (SEQ ID NO: 10). В еще одном варианте осуществления VH содержит модификации в положениях 5, 8, 12, 16 и 17 CDR2 (SEQ ID NO: 4) и положениях 2 и 3 CDR3 (SEQ ID NO: 5). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций VH- и VL-доменов, а также другие мутации в Fc-домене, раскрытые в данном документе, охватываются объемом настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит i) VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; ii) VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, но при этом в любом одном или нескольких из положений аминокислот, соответствующих положениям 1-17 (например, 4, 5 и 7-17) в последовательности под SEQ ID NO: 4, необязательно присутствует гистидин; и iii) VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, но при этом в любом одном или нескольких из положений аминокислот, соответствующих положениям 1-8 в последовательности под SEQ ID NO: 5, необязательно присутствует гистидин; и при этом VL содержит i) VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8; ii) VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и iii) VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10; но при этом в любом одном или нескольких из положений аминокислот, соответствующих положениям 1-14 в последовательности под SEQ ID NO: 10, необязательно присутствует гистидин. В некоторых вариантах осуществления VH содержит i) VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, ii) VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, iii) VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и при этом VL содержит i) VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, ii) VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, iii) VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит гистидин в положении аминокислоты, соответствующем любому одному или нескольким из положений 7, 8, 12, 15, 16 или 17 в последовательности под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит гистидин в положении аминокислоты, соответствующем любому одному или нескольким из положений 2 или 3 в последовательности под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит гистидин в положениях аминокислоты, соответствующем любому одному или нескольким из положений 1, 5, 6 или 14 в последовательности под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления гистидин присутствует в положениях аминокислот, соответствующих положениям 5, 8, 12, 16 и 17 в последовательности под SEQ ID NO: 4; и при этом гистидин присутствует в положениях аминокислот, соответствующих положениям 2 и 3 в последовательности под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504, 514, 524, 534, 544, 554, 564, 574, 584, 594, 604, 614, 624, 634, 644, 654, 664, 674, 684, 694, 704, 714, 724, 734, 744, 754, 764, 774, 784, 794, и 811-818. В некоторых вариантах осуществления VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 525, 535, 545, 555, 565, 575, 585, 595, 605, 615, 625, 635, 645, 655, 665, 675, 685, 695, 705, 715, 725, 735, 745, 755, 765, 775, 785, 795, и 819-820. В некоторых вариантах осуществления VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790 и 800. В некоторых вариантах осуществления VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 14; при этом VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 15, и при этом VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 811; VH-

CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 819, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 10 или 20. В некоторых вариантах осуществления VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 814; VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 820, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 10 или 20. В некоторых вариантах осуществления VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 816; VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 15, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 10 или 20. В некоторых вариантах осуществления VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 818; VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 15, и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 10 или 20. В некоторых вариантах осуществления VH содержит каркасные области, каждая из которых по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 803-806. В некоторых вариантах осуществления VL содержит каркасные области, каждая из которых по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 807-810. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782 и 792. В некоторых вариантах осуществления VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787 и 797. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 12, и VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 821, и VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 7 или 17. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 824, и VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 7 или 17. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 827, и VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 7 или 17. В некоторых вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 831, и VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 7 или 17.

Настоящее изобретение также включает антитела к PAR2, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (CH), где химерная CH-область содержит сегменты, полученные из CH-областей более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать химерную CH-область, содержащую часть CH2-домена или весь CH2-домен, полученный из молекулы IgG₁ человека, IgG₂ человека или IgG₄ человека, объединенный с частью CH3-домена или всем CH3-доменом, полученным из молекулы IgG₁ человека, IgG₂ человека или IgG₄ человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат химерную CH-область, содержащую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность, представляющую собой "верхний шарнир" (аминокислотные остатки от положения 216 до 227 согласно нумерации по EU), полученную из шарнирной области IgG₁ человека, IgG₂ человека или IgG₄ человека, объединенную с последовательностью, представляющей собой "нижний шарнир" (аминокислотные остатки от положения 228 до 236 согласно нумерации по EU), полученной из шарнирной области IgG₁ человека, IgG₂ человека или IgG₄ человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из "верхнего шарнира" IgG₁ человека или IgG₄ человека, и аминокислотные

остатки, полученные из "нижнего шарнира" IgG₂ человека. Fc антитела, содержащего химерную СН-область, как описывается в данном документе, в определенных вариантах осуществления может демонстрировать модифицированные эффекторные функции без нежелательного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела (см., например, US 2015-0203591 A1).

Настоящее изобретение включает антитела или антигенсвязывающие фрагменты к PAR2, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами PAR2. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот PAR2. В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества аминокислот (или аминокислотных последовательностей) PAR2, не образующих непрерывную последовательность.

Различные методики, известные специалистам среднего уровня квалификации в данной области техники, могут быть использованы для установления того, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в полипептиде или белке. Иллюстративные методики включают, например, стандартный анализ с перекрестным блокированием, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк), мутационный анализ на основе аланинового сканирования, блот-анализ пептидов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ с использованием расщепления на пептиды. Кроме того, можно применять способы, такие как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который может быть использован для идентификации в полипептиде аминокислот, с которыми взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ на основе водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение представляющего интерес белка с помощью дейтерия с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы водородно-дейтериевый обмен произошел во всех остатках, кроме остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Настоящее изобретение, кроме того, включает антитела к PAR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с одним и тем же эпитопом, что и любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 12 и 17). Подобным образом, настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты к PAR2, которые конкурируют за связывание с PAR2 с любым из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 12 и 17). Специалист может легко установить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и антитело сравнения к PAR2, или конкурирует за связывание с ним, с применением стандартных способов, известных из уровня техники и иллюстрируемых в данном документе. Например, для установления того, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и антитело сравнения к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивают связывание антитела сравнения с белком PAR2. Затем оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой PAR2. Если исследуемое антитело способно связываться с PAR2 после насыщения связывания антителом сравнения к PAR2, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с эпитопом, отличным от того, с которым связывается антитело сравнения к PAR2. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой PAR2 после насыщения связывания антителом сравнения к PAR2, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, с которым связывается антитело сравнения к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением. Затем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (например, анализ с внесением мутаций в пептид и анализ связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается антитело сравнения, или за наблюдаемое отсутствие связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с применением ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного из уровня техники. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, два антитела связываются с одним и тем же эпитопом (или перекрывающимися эпитопами), если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, в случае определения в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502).

В качестве альтернативы считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые обеспечивают уменьшение или предотвращение связывания одного антитела, обеспечивают уменьшение или предотвращение связывания другого.

Считается, что два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только некоторое подмножество аминокислотных мутаций, которые обеспечивают уменьшение или предотвращение связывания одного антитела, обеспечивают уменьшение или предотвращение связывания другого.

Чтобы установить, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с антителом сравнения к PAR2, описанный выше метод связывания выполняется в двух направлениях. В случае первого направления обеспечивают связывание антитела сравнения с белком PAR2 с обеспечением условий для насыщения с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой PAR2. В случае второго направления обеспечивают связывание исследуемого антитела с молекулой PAR2 с обеспечением условий для насыщения с последующей оценкой связывания антитела сравнения с молекулой PAR2. Если в случае обоих направлений только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой PAR2, тогда делают вывод о том, что исследуемое антитело и антитело сравнения конкурируют за связывание с PAR2. Как будет понятно специалисту среднего уровня квалификации в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с антителом сравнения, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и антитело сравнения, но может стерически блокировать связывание антитела сравнения путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Способы получения моноклональных антител, в том числе полностью человеческих моноклональных антител, известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно применять в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с PAR2 человека.

При применении технологии VELOCIMMUNE™, например, или любого другого известного способа получения полностью человеческих моноклональных антител сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к PAR2, содержащие вариабельную область человека и константную область мыши. Как в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и отбирают по желаемым характеристикам, в том числе по аффинности, селективности, эпитопу и т. д. При необходимости константные области мыши заменяют желаемой константной областью человека, например, из IgG₁ или IgG₄ дикого типа или модифицированного, с получением полностью человеческого антитела к PAR2. В то время как выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, такие характеристики, как высокоаффинное связывание антигена и специфичность в отношении мишени, свойственны вариабельной области. В некоторых случаях полностью человеческие антитела к PAR2 выделяют непосредственно из антигенпозитивных В-клеток.

Антитела и фрагменты антител к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые могут отличаться от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать PAR2 (например, SEQ ID NO: 801), или, более конкретно, в некоторых вариантах осуществления привязанный лиганд PAR2 (например, SEQ ID NO: 802). Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по сути эквивалентна активности описанных антител. Подобным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытыми последовательностями, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела к PAR2, которое является по сути биоэквивалентным антителу или фрагменту антитела к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением. Примеры таких вариантных аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждаются выше.

Два антитела или антигенсвязывающих фрагмента считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, чья скорость и степень абсорбции не демонстрируют значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе в сходных экспериментальных условиях в виде либо одной дозы, либо нескольких доз. Некоторые антитела или антигенсвязывающие фрагменты будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же могут рассматриваться как биоэквивалентные, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

В некоторых вариантах осуществления два антитела или антигенсвязывающих фрагмента являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

В некоторых вариантах осуществления два антитела или антигенсвязывающих фрагмента являются биоэквивалентными, если пациента можно переключать один или несколько раз между продуктом сравнения и биологическим продуктом без ожидаемого повышения риска возникновения побочных эффектов, включающих клинически значимое изменение иммуногенности, или снижения эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В некоторых вариантах осуществления два антитела или антигенсвязывающих фрагмента являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и *in vitro*. Определение биоэквивалентности включает, например, (a) исследование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов определяют в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в виде функции времени; (b) исследование *in vitro*, которое было приведено в соответствие с данными о биодоступности для человека *in vivo* и является обоснованно прогностическим в отношении таковых; (c) исследование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором соответствующий немедленный фармакологический эффект антитела (или его мишени) определяют в виде функции времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, несущественные для биологической активности, могут быть удалены или заменены на другие аминокислоты для предотвращения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут включать варианты антитела к PAR2, содержащие аминокислотные изменения, которые обеспечивают модификацию характеристик гликозилирования антител или антигенсвязывающих фрагментов, например, мутации, которые обеспечивают предотвращение или устранение гликозилирования.

В настоящем изобретении согласно некоторым вариантам осуществления предусмотрены антитела или антигенсвязывающие фрагменты к PAR2, которые связываются с PAR2 человека, но не с PAR2 других видов. Настоящее изобретение также включает антитела к PAR2, которые связываются с PAR2 человека и с PAR2 от одного или нескольких отличных от человека видов. Например, антитела к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с PAR2 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или несколькими из PAR2 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, макаки-крабоведа, мармозетки, резуса или шимпанзе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с PAR2 в клетках линии A549 человека, клетках линии KNRK крысы, клетках линии CYNOM-K1 макаки-крабоведа или клетках линии LL/2 мыши.

Настоящее изобретение охватывает моноклональные антитела к PAR2, конъюгированные с терапевтическим компонентом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое средство, иммуносуппрессант или радиоизотоп. Примеры подходящих цитотоксических средств и химиотерапевтических средств для образования иммуноконъюгатов известны из уровня техники (см., например, WO 05/103081).

В некоторых вариантах осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного полипептида-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением могут быть соединены с другой функциональной молекулой, например другому пептиду или белку, или совместно экспрессироваться с ней. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть функционально соединены (например, с помощью химического сочетания, генетического слияния, нековалентной связи или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Например, настоящее изобретение включает биспецифические антитела, у которых одно плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении PAR2 человека или его фрагмента, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении второй терапевтической мишени или конъюгировано с терапевтическим компонентом.

Иллюстративный формат биспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который может использоваться в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого CH3 домена иммуноглобулина (Ig) и второго CH3 домена Ig, где первый и второй CH3 домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где отличие по меньшей мере по одной аминокислоте снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом без отличия по аминокислоте. В одном варианте осуществления первый CH3 домен Ig связывает белок А, а второй CH3 домен Ig содержит мутацию, которая снижает или подавляет связывание белка А, такую как модификация H95R (при нумерации экзонов по IMGT; H435R при нумерации по

EU). Второй СНЗ может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые могут находиться во втором СНЗ, включают следующие: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Вариации в биспецифическом формате антитела, описанные выше, предусмотрены объемом настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, слитые структуры типа IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрогибридому, структуры с соединением по типу "выступы-во-впадины", структуры с общей легкой цепью (например, общей легкой цепью с соединением по типу "выступы-во-впадины" и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, структуры с "лейциновой застежкой", Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и Mab<2>биспецифические форматы (обзор вышеупомянутых форматов см., например, в Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и ссылок, цитируемых там). Биспецифические антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут быть сконструированы с применением конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, такой, при которой используются не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью для создания сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенной композицией, валентностью и геометрией (см., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: 4 декабря, 2012]).

С. Нуклеиновые кислоты и системы экспрессии

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, способная экспрессировать любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. Нуклеиновые кислоты могут быть однонитевыми или двухнитевыми молекулами ДНК или РНК. В следующих вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты антитела или антигенсвязывающего фрагмента могут быть выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последовательностью или в библиотеке ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под любым из SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781 и/или 791. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под любым из SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, и/или 796. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, 6, 11 и/или 16.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, также содержат нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются при условиях высокой жесткости с полинуклеотидом, кодирующим любую из вышеупомянутой нуклеотидной последовательности антител или антигенсвязывающих фрагментов, или комплементарными ему последовательностями. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты гибридизуются при условиях высокой жесткости с полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под любым из SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782 и 792. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты гибридизуются при условиях высокой жесткости с полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности под любым из SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787 и 797. Специалисту среднего уровня квалификации в данной области техники будет понятно, что условия соот-

ветствующей жесткости, которые обеспечивают гибридизацию ДНК, могут варьировать. Например, гибридизацию можно выполнять при применении $6,0 \times$ хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующим промыванием с помощью $2,0 \times$ SSC при 50°C . Например, концентрация соли на стадии промывания может быть выбрана из диапазона концентраций от соответствующих условиям низкой жесткости, приблизительно $2,0 \times$ SSC при 50°C , до соответствующих условиям высокой жесткости, приблизительно $0,2 \times$ SSC при 50°C . Кроме того, температура на стадии промывания может быть повышена от соответствующей условиям низкой жесткости, комнатной температуры, составляющей приблизительно 22°C , до соответствующей условиям высокой жесткости, приблизительно 65°C . И значения температуры, и содержания соли могут варьировать, или значение температуры, или концентрации соли могут быть постоянными, тогда как другие переменные изменяются. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются при условиях низкой жесткости, соответствующих применению $6 \times$ SSC при комнатной температуре с последующим промыванием с применением $2 \times$ SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, из-за вырожденности генетического кода, также находящихся в пределах объема настоящего изобретения. Например, многие аминокислоты обозначаются более чем одним триплетом. Кодоны, которые определяют ту же аминокислоту, или синонимы (например, CAU и CAC являются синонимами гистидина) могут привести к возникновению "молчащих" мутаций, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако ожидается, что в клетках млекопитающих будут возникать случаи полиморфизма последовательностей ДНК, которые будут приводить к изменениям в аминокислотных последовательностях исследуемых белков. Специалисту в данной области будет понятно, что такие вариации одного или нескольких нуклеотидов (приблизительно до 3-5% нуклеотидов) в нуклеиновых кислотах, кодирующих конкретный белок, могут существовать между индивидами данного вида из-за естественных вариаций аллелей. Все без исключения такие варианты нуклеотидов и возникающие в результате случаи полиморфизма аминокислот находятся в пределах объема настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая любой из векторов, раскрытых в данном документе.

Независимо от того, является ли антитело в соответствии с настоящим изобретением полноразмерным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением можно экспрессировать в линиях клеток с помощью метода рекомбинации. В таких вариантах осуществления последовательности, кодирующие конкретные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина, такой как клетка-хозяин млекопитающего или клетка-хозяин дрожжей. Согласно этим вариантам осуществления трансформация может быть достигнута с применением любого известного способа введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, включая, например, упаковку полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансдукцию клетки-хозяина вирусом (или вектором), или с помощью процедур трансфекции, известных из уровня техники. Как правило, используемая процедура трансформации может зависеть от хозяина, подлежащего трансформации. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомах и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи (всю или часть), вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с настоящим изобретением, константной области легкой цепи, или вариабельную область легкой цепи в соответствии с настоящим изобретением, вставляют в соответствующий вектор экспрессии с применением стандартных методик лигирования. В предпочтительном варианте осуществления константная область тяжелой или легкой цепей присоединяется к С-концу соответствующей вариабельной области и лигируется в вектор экспрессии. Вектор обычно выбирают так, чтобы он был функциональным в конкретной используемой клетке-хозяине (т.е. вектор является совместимым с механизмом клетки-хозяина, так что может происходить амплификация гена и/или экспрессия гена). Обзор векторов экспрессии см. в Goeddel (ред.), 1990, Meth. Enzymol. том 185, Academic Press. Нью-Йорк. В контексте экспрессии антител как тяжелая, так и легкая цепи могут экспрессироваться из одного и того же вектора (например, из одного и того же или разных промоторов, присутствующих в одном и том же векторе), или тяжелая и легкая цепи могут экспрессироваться из разных векторов. В определенных вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи экспрессируются из разных векторов, которые трансфицируются в одну и ту же клетку-хозяина и совместно экспрессируются. Независимо от того, экспрессируются ли тяжелая и легкая цепи в одной и той же клетке-хозяине из одно-

го и того же вектора или из разных векторов, цепи могут затем связываться с образованием антитела (или фрагмента антитела, в зависимости от частей экспрессируемой тяжелой и легкой цепей).

Обычно векторы экспрессии, используемые в любой из клеток-хозяев, будут содержать последовательности для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности, в совокупности называемые "фланкирующими последовательностями", в определенных вариантах осуществления обычно будут включать одну или несколько следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или несколько энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную последовательность интрона, содержащую донорный и акцепторный сайт сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, сайт связывания с рибосомой, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подлежащий экспрессии, и элемент, представляющий собой селективный маркер. Эти части векторов хорошо известны, и существует множество общедоступных векторов, которые можно выбирать и использовать для экспрессии белков. Можно легко выбрать векторы на основании желаемой клетки-хозяина и желаемого применения.

Точка начала репликации обычно является частью этих векторов экспрессии прокариот, приобретаемых на коммерческой основе, и точка начала способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайт, представляющий собой точку начала репликации, его можно синтезировать химическим способом на основе известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а точки начала различных вирусов (например, SV40, полиомы, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусов, таких как HPV или BPV) применимы для векторов клонирования в клетках млекопитающих. Как правило, компонент, представляющий собой точку начала репликации, не требуется для векторов экспрессии в млекопитающих (например, точка начала SV40 часто используется только потому, что она также содержит ранний промотор вируса).

Векторы экспрессии и клонирования в соответствии с настоящим изобретением обычно будут содержать промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей тяжелую и/или легкую цепи. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т.е. в направлении 5') по отношению к стартовому кодону структурного гена (как правило, в пределах от приблизительно 100 до 1000 п.н.), которые контролируют транскрипцию структурного гена. Промоторы обычно группируются в один из двух классов: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы иницируют повышение уровней транскрипции ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторые изменения условий культивирования, таких как наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы иницируют непрерывное продуцирование генного продукта; то есть, контроль над экспрессией генов является незначительным или вообще отсутствует. Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Подходящий промотор функционально связывается с ДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепь, входящие в состав антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления один и тот же промотор используется как для тяжелой, так и для легкой цепи. В других вариантах осуществления для каждой используются разные промоторы (присутствующие в одном и том же или разных векторах).

Подходящие промоторы для использования с хозяевами, представляющими собой дрожжи, также хорошо известны из уровня техники. Энхансеры дрожжей преимущественно используются с промоторами дрожжей. Подходящие промоторы для использования с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают без ограничения промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы теплового шока и промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают без ограничения область раннего промотора SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-10); промотор CMV; промотор, содержащийся в 3' длинном концевом повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-97); промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. США 78:1444-45); регуляторные последовательности гена металлотинина (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); векторы экспрессии прокариот, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. США 75:3727-31) или промотор tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. США 80:21-25). Также представляют интерес следующие области транскрипционного контроля животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы у трансгенных животных: контрольная область гена эластазы I, которая активна в ацинозных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, Cell 38:639-46; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology

7:425-515); область контроля гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22); область контроля гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-58; Adames et al., 1985, Nature 318:533-38; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-44); область контроля вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, Cell 45:485-95); область контроля гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-76); область контроля гена альфа-фетопротейна, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-48; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); область контроля гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-71); область контроля гена бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-40; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); область контроля гена основного белка миелина, которая активна в олигодендронитах в головном мозге (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-12); область контроля гена легкой цепи 2 миозина-, которая активна в скелетных мышцах (Sani, 1985, Nature 314: 283-86); и область контроля гена гонадотропного рилизинг-гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason et al., 1986, Science 234: 1372-78).

Вектор также может содержать энхансерную последовательность для повышения уровня транскрипции ДНК, кодирующей легкую цепь или тяжелую цепь.

Векторы экспрессии в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать или могут не содержать все из необходимых фланкирующих последовательностей. Если одна или несколько из фланкирующих последовательностей, описанных в данном документе, еще не присутствуют в векторе, они могут быть получены отдельно и лигированы в вектор. Способы, используемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области.

После того как вектор был сконструирован и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь или тяжелую цепь или легкую цепь и тяжелую цепь, входящие в состав антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, была вставлена в соответствующий сайт вектора, готовый вектор может быть вставлен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформация вектора экспрессии в выбранную клетку-хозяина может быть осуществлена хорошо известными способами, включающими трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, или другие известные методики. Выбранный способ будет частично зависеть от типа используемой клетки-хозяина. Эти способы и другие подходящие способы хорошо известны специалисту.

Клетка-хозяин при культивировании в соответствующих условиях синтезирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, которые впоследствии могут быть собраны из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует их в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей их (если она их не секретирует). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как желаемые уровни экспрессии, модификации полипептида, которые являются желательными или необходимыми для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование) и легкость укладки в биологически активную молекулу.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве клеток-хозяев для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения многие иммортализованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), в том числе без ограничения клетки яичника китайского хомячка (линии CHO), клетки линии HeLa, клетки почки детеныша хомяка (линии ВНК), клетки почки обезьяны (линии COS), клетки гепатоклеточной карциномы человека (например, линии Нер G2) и ряд других клеточных линий. В другом варианте осуществления клеточную линию можно выбрать из линии В-клеток, которая не производит свое собственное антитело, но обладает способностью вырабатывать и секретировать гетерологичное антитело (например, линии клеток миеломы мыши NS0 и SP2/0). В других вариантах осуществления используют клетку, отличную от клетки млекопитающего, такую как линия клеток дрожжей (например, Pichia).

В определенных вариантах осуществления клеточная линия экспрессирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением стабильно. В других вариантах осуществления клетки экспрессируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением временно.

D. Терапевтический состав и введение

В настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитела к PAR2 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением составляют с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество соответствующих составов можно найти в известном всем химикам-фармацевтам справочнике "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды,

содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии на основе карбовакс (полиэтиленгликоли с разными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимого пациенту, может варьировать в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п.

Предпочтительную дозу обычно рассчитывают по весу тела или площади поверхности тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и длительность лечения можно регулировать. Эффективные дозировки и схемы для введения антител или антигенсвязывающих фрагментов к PAR2 могут быть установлены эмпирически; например, за прогрессом пациента можно наблюдать путем периодической оценки и соответственно регулировать дозу. Более того, межвидовое масштабирование дозировок может быть выполнено с применением хорошо известных из уровня техники способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Различные системы доставки известны и могут применяться для введения фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, интратекальный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.), и их можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

В некоторых вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты находят применение в лечении состояний и нарушений, связанных с центральной нервной системой и, в частности, связанных с головным мозгом. При том, что при введении макромолекулы, такой как антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в головной мозг субъекта необходимо учитывать различные факторы, т.е. способность антитела или антигенсвязывающего фрагмента преодолевать гематоэнцефалический барьер (БВВ), квалифицированному специалисту известны способы введения таких макромолекул в головной мозг. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ковалентно модифицированы с помощью одного или нескольких катионных полиаминов, таких как гексаметилендиамин или тетраметилендиамин, для повышения вероятности того, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент пройдет через БВВ. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или фрагмент нацеливается на PAR2, а также нацеливается на рецептор, который облегчает транспорт через БВВ (например, рецептор трансферрина, рецептор инсулина и ТМЕМ30А). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован со средством, которое нацеливается на рецептор, который облегчает транспорт через БВВ (например, рецептор трансферрина, рецептор инсулина и ТМЕМ30А). В некоторых вариантах осуществления БВВ временно нарушается до или во время введения антитела или фрагмента. В некоторых вариантах осуществления БВВ временно нарушают с помощью ультразвука, облучения, биохимической обработки (например, с помощью агониста рецептора K_{Ca} , такого как NS-1619) или внутриартериальной инфузии концентрированных гиперосмотических растворов.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, устройство для доставки в виде шприца-ручки находит широкое применение в доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Такое устройство доставки в виде шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки в виде шприца-ручки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция в картридже введена, и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство доставки в виде шприца-ручки затем может быть повторно использовано. В одноразовом устройстве для доставки в виде шприца-ручки нет сменного картриджа. Вместо этого, одноразовое устройство для доставки в виде шприца-ручки поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Когда в резервуаре фармацевтическая композиция заканчивается, все устройство выбрасывается.

Множество многоразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки и автоинъектора находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Швейцария), шприц-ручку

HUMALOGMIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly и Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия) и многие другие. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки, находящие применение в подкожной доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, Иллинойс) и многие другие.

В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может доставляться в виде системы с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может быть использован насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления можно применять полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (ред.), 1974, CRC Pres., Бока-Ратон, Флорида. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, таким образом, требуется только часть системной дозы (см, например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, том 2, с. 115-138). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, интратекальных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т. д. Такие инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты могут быть получены, например путем растворения, суспендирования или эмульгирования любых из антигенов или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, или их соли, описываемой выше, в стерильной водной среде-носителе или в масляной среде-носителе, традиционно используемой для инъекций. В качестве водной среды-носителя для инъекций выступает, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу, другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды-носителя используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в виде лекарственных форм с единичной дозой, подобранной таким образом, чтобы соответствовать дозе действующих веществ. Такие лекарственные формы с единичной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося вышеуказанного антигена обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму с единичной дозой; особенно в случае форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеуказанное антигеном или его антигенсвязывающий фрагмент содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других дозированных форм.

Е. Терапевтические пути применения антигенов

В отношении любого из способов, описанных в данном документе, настоящее изобретение охватывает применение любого из антигенов или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения нарушения у субъекта, в которое вовлекается нежелательная и/или aberrантная активность PAR2, включающий введение любого из антигенов или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе. Как используется в данном документе, термины "нарушение", "состояние" и "заболевание" используют взаимозаменяемо в отношении любых из нарушений, состояний или заболеваний, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание/нарушение/состояние, в которое вовлекается нежелательная и/или aberrантная активность PAR2, представляет собой заболевание/нарушение/состояние, связанное с aberrантным или нежелательным воспалением. Примеры заболеваний/нарушений/состояний, в которые вовлекается aberrантная и/или нежелательная активность PAR2, включают острую или хроническую боль, острый или хронический зуд, острое или хроническое воспаление (например, острое или хроническое воспаление суставов, легких, головного мозга, желудочно-кишечного тракта, периодонта, кожи и сосудистой системы), аутоиммунные нарушения, периодонтит, астеартрит, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, артрит, псориаз, ожирение, диабет, сердечно-сосудистое заболевание, панкреатит, рак (например, рак молочной железы, легкого,

толстой кишки, желудка или предстательной железы), астму, фиброз, язвы желудка, фиброз или фиброзные нарушения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, контактный дерматит, болезнь Крона, язвенный колит, респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), гломерулонефрит и менингит. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта с метаболическим синдромом или с одним или несколькими состояниями, связанными с метаболическим синдромом, такими как висцеральное отложение жира, гипертензия, нарушенный гомеостаз глюкозы и инсулина, инсулиновая резистентность, эндотелиальное повреждение, сердечнососудистая гипертрофия, воспаление, сосудистое воспаление, атеросклероз, сократительная дисфункция желудочка, фиброз и жировая болезнь печени. В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения боли, например, боли, связанной с любым из заболеваний/нарушений/состояний, раскрытых в данном документе (например, боли при остеоартрите). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ препятствования взаимодействию между протеазой (например, трипсином) и PAR2, включающий стадию введения любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, в клетку. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования воздействия на привязанный лиганд PAR2 на клетке, включающий стадию введения любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, в клетку. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования взаимодействия между привязанным лигандом PAR2 и второй трансмембранной петлей белка PAR2, включающий стадию введения любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, в клетку. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования активации рецептора PAR2 в клетке, включающий стадию введения любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, в клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой нейрон (например, чувствительный нейрон). В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В других вариантах осуществления клетка находится в субъекте. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает любым из нарушений, раскрытых в данном документе.

В отношении любого из способов, описанных в данном документе, настоящее изобретение охватывает комбинацию любой стадии или стадий одного способа с любой стадией или стадиями из другого способа. Эти способы предусматривают введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения в соответствии с настоящим изобретением, подходящего для конкретного заболевания или состояния. В определенных вариантах осуществления эти способы предусматривают доставку любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, в клетки нуждающегося в этом субъекта.

Термины "лечение", "процесс лечения", "облегчение" и т.п. используют в данном документе, как правило, в значении получения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта, а также могут применяться в отношении улучшения, облегчения и/или снижения тяжести одного или нескольких симптомов состояния, подлежащего лечению. Эффект может быть профилактическим, что выражается в полном или частичном замедлении возникновения или рецидива заболевания, состояния или его симптомов, и/или может быть терапевтическим, что выражается в частичном или полном излечении от заболевания или состояния и/или нежелательного эффекта, относящегося к заболеванию или состоянию. Термин "лечение", как используется в данном документе, охватывает любое лечение заболевания или состояния млекопитающего, в частности человека, и включает любое одно или несколько из следующего: (a) предупреждения проявления заболевания или состояния у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию или состоянию, но его наличие еще не было диагностировано; (b) ингибирования заболевания или состояния (например, остановки его развития) или (c) ослабления заболевания или состояния (например, обуславливания регрессии заболевания или состояния с обеспечением улучшения в отношении одного или нескольких симптомов). Например, "лечение" боли (например, боли при остеоартрите) предусматривает снижение, прекращение, облегчение или устранение болевых симптомов у получающего лечение субъекта. Популяция субъектов, получающих лечение с помощью такого способа лечения заболевания, включает субъектов, страдающих нежелательным состоянием или заболеванием, а также субъектов с риском развития состояния или заболевания.

В отношении любого из способов, описанных в данном документе, настоящее изобретение охватывает применение любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящей заявке. Кроме того, в отношении любого из способов, описанных в данном документе, настоящее изобретение охватывает комбинацию любой стадии или стадий одного способа с любой стадией или стадиями из другого способа.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения состояний, связанных с любым из заболеваний/состояний/нарушений, раскрытых в данном докумен-

те, например, острой или хронической боли (например, боли при остеоартрите). Эти способы предусматривают введение индивидууму терапевтически эффективного количества любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных выше. Эти способы, в частности, направлены на терапевтические и профилактические средства для лечения животных и более конкретно людей. Настоящее изобретение предусматривает все комбинации любых из приведенных выше аспектов и вариантов осуществления, а также комбинации с любыми вариантами осуществления, изложенными в подробном описании и примерах.

Термин "терапевтически эффективная доза" означает дозу, которая дает желаемый эффект, для которого ее вводят. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет определяться специалистом в данной области с применением известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

В определенных вариантах осуществления любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными соединениями или терапевтическими средствами для лечения любого из заболеваний/состояний/нарушений, раскрытых в данном документе, например, острой или хронической боли (например, боли при остеоартрите). Например, любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, могут быть совместно введены в сочетании с одним или несколькими терапевтическими соединениями. При указании совместного введения комбинаторная терапия может охватывать одновременное или чередующееся введение. Кроме того, комбинация может охватывать однократное или длительное введение. Необязательно, антитело/антигенсвязывающий фрагмент и дополнительные соединения действуют аддитивным или синергическим образом для лечения любого из заболеваний/состояний/нарушений, раскрытых в данном документе, например, острой или хронической боли (например, боли при остеоартрите). Дополнительные соединения, подлежащие использованию в виде комбинации терапевтических средств, включают без ограничения, малые молекулы, полипептиды, антитела, антисмысловые олигонуклеотиды и молекулы siRNA. В некоторых вариантах осуществления дополнительное соединение представляет собой любое одно или несколько из противовоспалительного лекарственного средства, анальгетика, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID), кортикостероида, гиалуроновой кислоты, ацетаминофена, кодеина, лорсета, лортаба, викодина, гидрокодона, морфина, оксиконтин, роксикодона, перкоцета, аспирина, целекоксиба, прегабалина, слияния сустава, замещения сустава, абатацепта, адалимумаба, анакинра, цертолизумаба, этанерцепта, голимумаба, инфликсимаба, ритуксимаба, тоцилизумаба и тофацитиниба. В зависимости от характера комбинаторной терапии введение антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем изобретении, может продолжаться, в то время, когда вводится другое терапевтическое средство, и/или после этого. Введение антител или антигенсвязывающих фрагментов может выполняться в виде однократной дозы или в виде нескольких доз. В некоторых случаях введение антитела или антигенсвязывающих фрагментов начинают по меньшей мере за несколько дней до начала введения другого терапевтического средства, тогда как в других случаях введение начинают либо непосредственно перед, либо во время введения другого терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления любое из дополнительных соединений, раскрытых в данном документе, конъюгируют с любым из антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе.

В другом примере комбинаторной терапии любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением можно применять в виде части терапевтического режима в сочетании с одним или несколькими дополнительными процедурами лечения. В качестве примера такие другие процедуры лечения включают без ограничения диетическую терапию, трудовую терапию, физиотерапию, психиатрическую терапию, массаж, иглоукальвание, точечный массаж, средства передвижения, животных помощников и т.п.

Следует отметить, что хотя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, можно применять в комбинации с другими терапевтическими средствами, в определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют в форме монотерапии. Независимо от того, вводятся ли они отдельно или в комбинации с другими медикаментами или терапевтическими режимами, дозировка, частота, путь введения и время введения антител или антигенсвязывающих фрагментов устанавливаются врачом на основании состояния и потребностей пациента.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения несколько доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к PAR2 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к PAR2 и любого из дополнительных терапевтических средств, упомянутых в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного времени. Способы согласно этому аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением. Как используется в данном документе, термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2 вводят субъекту в отдельный момент времени, например, в разные дни, разделенные предварительно установленным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые предусматривают последовательное введе-

ние пациенту однократной начальной дозы антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2 с последующей одной или несколькими вторичными дозами антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2 и необязательно с последующей одной или несколькими третичными дозами антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, термин "начальная доза" означает дозу, которую вводят в начале режима лечения (также называемую "исходной дозой"); термин "вторичные дозы" означает дозы, которые вводят после начальной дозы; а термин "третичные дозы" означает дозы, которые вводят после вторичных доз. Все начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одно и то же количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2, но, как правило, они могут отличаться друг от друга частотой введения. В определенных вариантах осуществления, однако, количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента к PAR2, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах варьирует (например, повышается или понижается при необходимости) на протяжении курса лечения. В определенных вариантах осуществления в начале режима лечения вводят две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы в виде "нагрузочных доз", а затем последующие дозы, которые вводят с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

F. Диагностические/другие пути применения антител или антигенсвязывающих фрагментов

Антитела к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением также можно применять для выявления и/или определения количества PAR2 или экспрессирующих PAR2 клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело к PAR2 или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) PAR2.

Иллюстративные диагностические анализы на PAR2 могут предусматривать, например, ведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к PAR2 в соответствии с настоящим изобретением, где антитело к PAR2 является меченым выявляемой меткой или репортерной молекулой.

В качестве альтернативы, немеченое антитело к PAR2 использовать в диагностических применениях в комбинации со вторичным антителом, которое само мечено выявляемой меткой. Выявляемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный компонент, такой как флуоресцеин изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Специфические иллюстративные анализы, которые можно применять для выявления или определения количества PAR2 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Для композиций в соответствии с настоящим изобретением существует множество путей применения. Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением применимы для исследования предпочтительного клеточного и тканевого распределения в клетках и в тканях *in vitro* и/или *in vivo*. Подобным образом, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, либо отдельно, либо конъюгированные с гетерологичным средством, применимы в качестве визуализирующих средств, например, для диагностических применений *ex vivo* или *in vivo*. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, конъюгированные с радиоактивным компонентом, применимы для исследований с визуализацией *ex vivo* или *in vivo*. Подобным образом, любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением применимы подобным образом.

При использовании *in vitro* антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением подходят для идентификации партнеров по связыванию для антитела или антигенсвязывающего фрагмента, подлежащего доставке (например, для идентификации белков или пептидов, которые связывают антитело или антигенсвязывающий фрагмент), а также для оценки локализации и миграции. Подобным образом, при использовании *in vivo* антитела или антигенсвязывающие фрагменты применимы для идентификации партнеров по связыванию для антитела или антигенсвязывающего фрагмента, подлежащего доставке (например, для идентификации белков или пептидов, которые связывают антитело или антигенсвязывающий фрагмент), для оценивания локализации и миграции, для оценивания биораспределения и времени полужизни и для оценивания иммуногенности.

G. Животные/клеточные модели

Специалисту известно множество животных моделей, которые могли бы оказаться полезными для изучения любого из антител или их фрагментов. См., например, Kuyinu et al., 2016, J Orthop Surg Res, 11(19): 10.1186/s13018-016-0346-5. В некоторых вариантах осуществления животная модель представляет собой основанную на боли модель, создаваемую путем обработки животного химическим соединением, таким как моноиодатетат натрия (MIA) или каррагенан. В некоторых вариантах осуществления химическое соединение вводят путем инъекции в участок, на котором индуцируют боль у животного. В некоторых вариантах осуществления животная модель представляет собой животное, повреждение у которого осуществляют после операции (например, после разрезания), например, разрез передней крестообразной связки, менискэктомия или медиальный разрез мениска. В некоторых вариантах осуществления живот-

ная модель представляет собой модель, связанную с воспалительным состоянием, таким как раздражение нижних отделов пищевода, воспаление толстой кишки, изъязвление желудка, воспаление мочевого пузыря, воспаление поджелудочной железы и воспаление матки. См., например, животные модели, упомянутые в National Research Council Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, "Models of Pain," 2009.

Н. Наборы

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащим один или несколько контейнеров, заполненных по меньшей мере одним антителом или антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с настоящим изобретением. Необязательно, совместно с таким контейнером(ами) может прилагаться уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, и такое уведомление отражает: (а) одобрение агентства на производство, применение или продажу для введения человеку, (b) инструкции по применению или и то, и другое.

Примеры

Следующие примеры предусмотрены для того, чтобы предоставить специалистам среднего уровня квалификации в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением, и они не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают настоящим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, значениям количества, температуры и т.д.), но следует учитывать погрешности и отклонения эксперимента. Если не указано иное, части представляют собой части по весу, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приводится в градусах Цельсия, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Создание антител с чувствительным к pH связыванием PAR2

Создание рекомбинантных белков PAR2 и PAR1 человека, крысы и макака-крабеда

Конструкции на основе PAR2 (активируемого протеиназой рецептора 2) человека, крысы и макака-крабеда (*Macaca fascicularis*), содержащие внеклеточные остатки 1-75, разрабатывали с применением N-концевой метки AviTag™ (Avidity LLC) и C-концевых метки Flag, и полигистидиновой метки и клонировали в вектор pDEST12.2 OriP FH (Life Technologies). Конструкции на основе PAR1 (активируемого протеиназой рецептора 1) человека, содержащие внеклеточные остатки 1-102, разрабатывали с применением C-концевых метки Flag и полигистидиновой метки и клонировали в вектор pDEST12.2 OriP FH (Life Technologies). Конструкции экспрессировали в клетках линии FIEK293 и очищали от среды с применением стандартной очистки посредством аффинной и эксклюзионной хроматографии. Для создания биотинилированных белков AviTag™ биотинилировали ферментативным способом согласно инструкциям изготовителя.

Конструирование комбинаторных библиотек для гистидинового сканирования

Разрабатывали разделенные на пулы олигонуклеотиды для введения в каждое положение одного из VHCDR2, VHCDR3 или VLCDR3 в Par0067 гистидина или аминокислоты дикого типа. Затем конструировали три библиотеки на основе фагового дисплея scFv Par0067, в которых в каждой из VHCDR2, VHCDR3 или VLCDR3 содержалось от 0 до 100% гистидиновых остатков.

Отбор чувствительных к pH вариантных scFv Par0067

Комбинаторные библиотеки для гистидинового сканирования подвергали основанным на аффинности отборам с помощью фагового дисплея с целью выделения вариантов Par0067, которые связываются с PAR2 при pH 7,4, но при pH 6,0 их связывание снижается. Для достижения этого выполняли четыре цикла отбора с каждой библиотекой с применением понижающихся концентраций биотинилированного рекомбинантного PAR2 человека (Hawkins, RE et al., 1992 Aug 5;226(3):889-96). В каждом цикле фаг предварительно инкубировали в течение 1 ч с покрытыми стрептавидином парамагнитными гранулами (Dynabeads®) для удаления каких-либо связывающих стрептавидина. Затем покрытые стрептавидином гранулы удаляли с помощью магнита DYNAL® и отбрасывали, а оставшийся фаг добавляли к биотинилированному рекомбинантному PAR2 человека при pH 7,4. Отбор проводили в течение 2 ч перед добавлением покрытых стрептавидином парамагнитных гранул для захвата фага, связанного с биотинилированным рекомбинантным PAR2 человека. Гранулы промывали 5 раз с помощью PBS Tween (PBST) перед элюированием специфического scFv в буфере с низким pH (pH 5,5 - pH 6,0). Затем отобранные фаговые частицы с scFv извлекали, как описано ранее (Osbourne JK. et al. Immunotechnology, 2(3): 181-96, 1996), и процесс отбора повторяли в присутствии понижающихся концентраций биотинилированного PAR2 (1 нМ - 0,05 нМ за 4 цикла).

Изменение формата scFv на IgG1-TM

Антитела преобразовывали из scFv в формат антитела в виде иммуноглобулина G1 с тройной мутацией (IgG1-TM, Fc-последовательность IgG1 с введенными мутациями L234F, L235E и P331S), главным образом как описано в Persic et al. (1997, Gene, 187, 9-18) со следующими модификациями. Фрагмент

OgIP включали в векторы экспрессии для облегчения использования клеток линии CHO для временной трансфекции и для обеспечения возможности эписомной репликации. Варибельный домен тяжелой цепи (VH) клонировали в вектор, содержащий константные домены тяжелой цепи человека и регуляторные элементы для экспрессии целой тяжелой цепи IgG1-ГМ в клетках млекопитающих. Аналогично, варибельный домен легкой цепи (VL) клонировали в вектор для экспрессии константных доменов легкой цепи (лямбда) человека, который содержал регуляторные элементы для экспрессии целой легкой цепи IgG в клетках млекопитающих. Для получения IgG векторы, экспрессирующие тяжелую и легкую цепь IgG, трансфицировали в клетки млекопитающих для временной трансфекции на основе линии CHO (Daramola et al. *Biotechnol Prog* 30(1): 132-41 (2014)). IgG экспрессировались и секретируются в среду. Собранный материал фильтровали перед очисткой, затем IgG очищали с применением хроматографии с белком А. Образцы надосадочной жидкости с культуры загружали на колонку соответствующего размера с белком А Ceramic (BioSeptra) и промывали с помощью 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl. Связанный IgG элюировали из колонки с помощью 0,1 М цитрата натрия (pH 3,0) и нейтрализовали посредством добавления Tris-HCl (pH 9,0). В элюированном материале осуществляли замену буфера на PBS с применением колонок Nap10 (Amersham, № 17-0854-02) и концентрации IgG устанавливали спектрофотометрически с применением коэффициента экстинкции на основании аминокислотной последовательности IgG (Mach et al., *Anal. Biochem.* 200(1):74-80 (1992)). Очищенные IgG анализировали в отношении агрегации и разрушения с применением SEC-HPLC и SDS-PAGE.

Скрининг на предмет чувствительных к pH вариантных scFv и IgG Par0067

Для скрининга и определения профиля антител с потенциальным pH-зависимым связыванием использовали формат биохимического анализа конкуренции за эпитоп. Анализ, в котором использовалась технология гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF™), разрабатывали для оценки способности исследуемых антител (scFv или IgG) ингибировать взаимодействие связывания исходного антитела IgG Par0067 с внеклеточным доменом (ECD)PAR2 человека. Важно отметить, что анализ проводили при двух разных значениях pH (pH 7,4 и pH 6,0).

Параллельные анализы при pH 7,4 и pH 6,0 (как описано выше) были сначала использовали для скрининга необработанного неочищенного scFv (бактериальные экстракты) в одноточечном 384-луночном скрининге с высокой пропускной способностью (HTS). Данный формат одноточечного параллельного HTS позволил осуществить скрининг многих тысяч исследуемых scFv, и те антитела, у которых в результате получали пониженное ингибирование взаимодействия, представляющего собой связывание исходного IgG Par0067 с PAR2 человека, при pH 6,0 по сравнению с таковым при pH 7,4, брали для дальнейшей характеристики. Затем тот же подход, представляющий собой анализ конкуренции за эпитоп, осуществляли в формате определения многоточечного дозозависимого эффекта по IC₅₀ для исследования как очищенного scFv, так и очищенного IgG (в последнем случае требовалась небольшая модификация схемы анализа, как изложено в разделе C). Опять анализы проводили при pH 7,4 и pH 6,0, однако в этих экспериментах авторов настоящего изобретения больше всего интересовали исследуемые антитела, кривые ингибирования дозозависимого эффекта которых показывали значительное смещение вправо (т. е. значительно повышенное значение IC₅₀) при pH 6,0 относительно соответствующих кривых ингибирования дозозависимого эффекта, наблюдаемых при pH 7,4.

Следующий протокол включает способы как одноточечного исследования необработанного неочищенного scFv, так и последующего исследования очищенных scFv и IgG.

Раздел А. Общие условия анализа

Аналитические буферы

В день использования получали свежие аналитические буферы. Для экспериментов при pH 7,4 в DPBS (Gibco 14190-086) добавляли KF (0,4 М) (VWR, 103444Т) и BSA (0,1% вес./об.) (PAA, K05-013), а затем проверяли pH и точно доводили до pH 7,4 при необходимости. Для экспериментов при pH 6,0 при сохранении всех других буферных компонентов идентичными таковым в аналитическом буфере для pH 7,4, описанном выше, аналитический буфер для pH 6,0 составляли с применением основного буфера, представляющего собой 200 mM MES (Sigma, M-5287) (вместо DPBS). После добавления KF (0,4 М) и BSA (0,1% вес./об.) буфер на основе 200 mM MES затем доводили до pH 6,0 с помощью HCL.

Аналитические планшеты

Анализ выполняли с применением 384-луночных планшетов с черными мелкими лунками (с круглым дном, без связывания) (Corning, 4514)

Объем анализа: 20 мкл.

Инкубация и считывание планшетов

Аналитические планшеты инкубировали в течение 2 ч при к. т. перед считыванием с применением стандартного протокола считывания HTRF™ на устройстве для считывания планшетов Envision.

Раздел В. Исследование scFv. (Неочищенные бактериальные лизаты и очищенный scFv)

Порядок добавления и аналитические компоненты

	Суммарное	nsb	Исследование
IgG Par0067 (x4 [конечный])	5 мкл	5 мкл	5 мкл
Исследуемый scFv (x4 [конечный])	-	-	5 мкл
Аналитический буфер	5 мкл	5 мкл	-
ECD Bio-human-PAR2 (x4 [конечный])	5 мкл	-	5 мкл
Аналитический буфер	-	5 мкл	-

Меченый криплатом европия стрептавидин плюс меченое XL⁶⁶⁵ антитело к Fc человека (оба x4 [конечный]) 5 мкл 5 мкл 5 мкл

Получение/добавление IgG Par0067

Немеченое очищенное IgG Par0067 (полученное на месте) доводили до концентрации 4,44 нМ (1,11 нМ конечной [анализ]) в каждом из двух аналитических буферов, описанных ранее в разделе А (рН 7,4 и рН 6,0). Во все лунки соответствующего аналитического планшета добавляли по 5 мкл/лунка раствора 4,44 нМ IgG Par0067 с соответствующим рН (рН 7,4 и рН 6,0).

Получение/добавление исследуемого scFv

а) Для параллельного одноточечного HTS образцов scFv в виде необработанного неочищенного бактериального лизата как при рН 7,4, так и при рН 6,0 образцы сначала предварительно разбавляли до 40% от их исходной концентрации с применением аналитического буфера либо с рН 7,4, либо с рН 6,0, соответственно. Затем 5 мкл предварительно разбавленного до 40% образца переносили в соответствующий анализ (рН 7,4 или рН 6,0) для получения конечной концентрации аналитического образца 10,0% (в конечном аналитическом объеме 20 мкл). Во все эксперименты HTS включали исходный scFv Par0067 в качестве контроля, а также специфические зависимые от рН антитела, когда те становились доступными (для сопоставительного анализа).

б) Для исследования многоточечного дозозависимого эффекта по IC₅₀ очищенного антитела, представляющего собой scFv, образцы исследовали при верхней конечной аналитической концентрации, составляющей 1/4 от исходного неразбавленного образца (т.е. не выполняли стадию предварительного разбавления). Затем получали 11 точек серийных разведений 1:3, каждое в двух повторностях, в 384-луночных полипропиленовых планшетах Greiner в каждом из двух аналитических буферов (рН 7,4 и 6,0). По 5 мкл на лунку каждого серийного разведения переносили из планшета для разбавления scFv при соответствующем рН в соответствующий аналитический планшет (рН 7,4 и рН 6,0). По 5 мкл аналитического буфера при соответствующем рН добавляли в лунки "Суммарное" и "Неспецифическое" (nsb). Во все многоточечные эксперименты определения дозозависимого эффекта по IC₅₀ включали неочищенное сходное scFv Par0067 в качестве контроля, а также специфические зависимые от рН очищенные scFv, когда те становились доступными (для сопоставительного анализа). Данные представлены в табл. 1.

Получение/добавление биотинилированного ECD PAR2 человека

Полученный на месте биотинилированный ECD PAR2 человека разбавляли в каждом из двух аналитических буферов (рН 7,4 и рН 6,0) с получением рабочих растворов при 4,0 нМ (конечная аналитическая концентрация 1 нМ). Затем добавляли по 5 мкл/лунка соответствующего рабочего раствора 4,0 нМ биотинилированного ECD PAR2 человека во все лунки соответствующего аналитического планшета (рН 7,4 и рН 6,0), за исключением лунок отрицательного контроля связывания. По 5 мкл аналитического буфера при соответствующем рН добавляли в лунки отрицательного контроля связывания.

Получение/добавление реагента для выявления с помощью HTRF

Меченый криплатом европия стрептавидин (CisBio, 610SAKLB) и меченое XL⁶⁶⁵ антитело к Fc человека (CisBio, 61HFCXLB) разбавляли аналитическим буфером при каждом рН (рН 7,4 и рН 6,0) с получением объединенных рабочих растворов при концентрациях 6,0 нМ (меченого криплатом европия стрептавидина) и 40 нМ (меченого XL⁶⁶⁵ антитела к Fc человека). Обеспечение 4-кратного разведения в анализе давало конечные аналитические концентрации 1,5 нМ (меченого криплатом европия стрептавидина) и 10 нМ (меченого XL⁶⁶⁵ антитела к Fc человека). Затем добавляли по 5 мкл/лунка объединенного рабочего раствора реагента для выявления HTRFTM при соответствующем рН во все лунки соответствующего аналитического планшета (рН 7,4 и рН 6,0).

Раздел С. Исследование очищенного IgG

Порядок добавления и аналитические компоненты

	Суммарное	nsb	Исследование
Меченый с помощью Dylight ⁶⁵⁰ IgG Par0067 (x4 [конечный])	5 мкл	5 мкл	5 мкл
Исследуемый IgG (x4 [конечный])	-	-	5 мкл
Аналитический буфер	5 мкл	5 мкл	-

ECD Bio-human-PAR2 (x4 [конечный])	5 мкл	-	5 мкл
Аналитический буфер	-	5 мкл	-
Меченый криптом европия стрептавидин (x4 [конечный])	5 мкл	5 мкл	5 мкл

Меченый с помощью Dylight650 IgG Par0067

Мечение IgG Par0067 с помощью Dylight⁶⁵⁰ выполняли с применением набора для мечения Dylight⁶⁵⁰ (№ по каталогу Thermo Scientific 84536). Мечение полученного на месте очищенного IgG Par0067 выполняли согласно рекомендованной изготовителем процедуре мечения. Установили, что конечная концентрация IgG Par0067, меченого с помощью Dylight⁶⁵⁰, составляла 0,56 мг/мл, при этом среднее отношение встраивания красителя Dylight⁶⁵⁰ к IgG составляло 2,7 моль красителя/моль IgG.

Получение/добавление IgG Par0067, меченого с помощью Dylight⁶⁵⁰

IgG Par0067, меченое с помощью Dylight⁶⁵⁰ (0,56 мг/мл, 3,733 нМ), доводили до концентрации 4,44 нМ (для получения 1,11 нМ конечной [анализ]) в каждом из двух аналитических буферов, описанных в разделе "Материалы" (рН 7,4 и рН 6,0). Добавляли по 5 мкл/лунка раствора 4,44 нМ IgG Par0067, Dylight⁶⁵⁰, меченого при соответствующем рН во все лунки соответствующего аналитического планшета (рН 7,4 и рН 6,0).

Серийное разбавление/добавление исследуемого IgG

Исходный IgG Par0067 (используемый в качестве сравнения/контроля во всех анализах) предварительно разбавляли с получением 2000 нМ стокового раствора в каждом из двух аналитических буферов с разными рН (для получения верхней конечной аналитической концентрации IgG, составляющей 500 нМ). Все исследуемые или другие IgG сравнения/контрольные IgG исследовали при верхней конечной аналитической концентрации, составляющей 1/4 от исходного неразбавленного образца (т.е. не выполняли стадию предварительного разбавления). Затем получали 11 точек серийных разведений 1:3, каждое в двух повторностях, в 384-луночных полипропиленовых планшетах Greiner в каждом из двух аналитических буферов (рН 7,4 и 6,0). По 5 мкл на лунку переносили из планшета для разбавления IgG при соответствующем рН в соответствующий аналитический планшет (рН 7,4 и рН 6,0). По 5 мкл аналитического буфера при соответствующем рН добавляли в лунки "Суммарное" и "Неспецифическое".

Получение/добавление биотинилированного ECD PAR2 человека

Полученный на месте биотинилированный ECD PAR2 человека разбавляли в каждом из двух аналитических буферов (рН 7,4 и рН 6,0) с получением рабочих растворов при 4,0 нМ (конечная аналитическая концентрация 1 нМ). Затем добавляли по 5 мкл/лунка соответствующего рабочего раствора 4,0 нМ биотинилированного ECD PAR2 человека во все лунки соответствующего аналитического планшета (рН 7,4 и рН 6,0), за исключением лунок отрицательного контроля связывания. По 5 мкл аналитического буфера при соответствующем рН добавляли в лунки отрицательного контроля связывания.

Получение/добавление реагента для выявления с помощью HTRF

Меченый криптом европия стрептавидин (CisBio, 610SAKLB) разбавляли аналитическим буфером при каждом рН (рН 7,4, и рН 6,0) с получением рабочих растворов при концентрации 6,0 нМ. Обеспечение 4-кратного разведения в анализе давало конечную аналитическую концентрацию меченого криптом европия стрептавидаина 1,5 нМ. Затем добавляли по 5 мкл/лунка рабочего раствора меченого криптом европия стрептавидаина при соответствующем рН во все лунки соответствующего аналитического планшета (рН 7,4 и рН 6,0).

Раздел D. Анализ данных

Сначала количество импульсов при 665 нм и 620 нм превращали в значения отношения 665/620. Затем рассчитывали дельта F (%) согласно следующему уравнению: Дельта F (%) = ((отношение для образца - отношение для отрицательного контроля)/отношение для отрицательного контроля) × 100.

Значения для отрицательного контроля рассчитывали при отсутствии IgG Par0067 в лунках соответствующего отрицательного контроля связывания.

Затем рассчитывали % специфического связывания согласно следующему уравнению:

% специфического связывания = $\{(\% \text{ дельта F образца} - \% \text{ дельта F отрицательного контроля связывания}) / (\% \text{ дельта F суммарного связывания} - \% \text{ дельта F отрицательного контроля связывания})\} \times 100$.

В случае одноточечного HTS строили график зависимости % специфического связывания при рН 6,0 от такового при рН 7,4 по осям x и y соответственно, для визуализации распределения scFv с пониженным ингибированием (более высокий % специфического связывания) при рН 6,0 по сравнению с рН 7,4.

В случае кривых многоточечного дозозависимого эффекта строили график зависимости значений % специфического связывания от концентрации исследуемого очищенного антитела (scFv или IgG). Значения IC₅₀ устанавливали путем аппроксимацией кривой по вариабельному наклону сигмоидальной кривой дозозависимого эффекта ингибирования (4-параметрическое логистическое уравнение) с применением программного обеспечения Graphpad Prism.

Таблица 1

Клон (scFv)	Анализ конкуренции <i>Par0067</i> за эпитоп			
	IC ₅₀ (нМ) при pH 7,4	IC ₅₀ (нМ) при pH 6,0	Вариант: Кратность IC ₅₀ (pH 6,0 против pH 7,4)	Кратность IC ₅₀ при pH 7,4 (вариант против <i>Par0067</i>)
Par0067	3,3	3,6	1,1	1,0
PaB670010	15,4	41,8	2,7	4,7
PaB670020	5,6	18,5	3,3	1,7
PaB670034	5,6	14,2	2,5	1,7
PaB670045	9,8	72,5	7,4	3,0
PaB670048	14,5	139,4	9,6	4,4
PaB670064	67,1	289,9	4,3	20,3
PaB670066	52,2	486,9	9,3	15,8
PaB670067	14,4	113,2	7,9	4,4
PaB670068	77,8	447,6	5,8	23,6
PaB670070	60,4	270,0	4,5	18,3
PaB670071	101,2	424,8	4,2	30,7
PaB670073	72,1	428,3	5,9	21,8
PaB670075	101,8	603,0	5,9	30,8
PaB670076	46,2	291,8	6,3	14,0
PaB670077	55,4	619,9	11,2	16,8
PaB670078	33,3	319,2	9,6	10,1
PaB670079	44,2	489,8	11,1	13,4
PaB670080	16,6	158,1	9,5	5,0
PaB670081	51,4	260,0	5,1	15,6
PaB670082	25,4	77,9	3,1	7,7
PaB670083	45,2	151,8	3,4	13,7
PaB670084	54,5	282,7	5,2	16,5
PaB670085	48,1	154,7	3,2	14,6
PaB670087	40,9	130,7	3,2	12,4
PaB670088	29,8	114,7	3,8	9,0
PaB670089	29,9	134,0	4,5	9,1
PaB670090	22,6	85,5	3,8	6,8
PaB670091	25,2	98,9	3,9	7,6
PaB670092	41,1	193,5	4,7	12,5
PaB670093	18,6	58,7	3,2	5,6
PaB670094	72,5	236,8	3,3	22,0
PaB670095	20,0	113,2	5,7	6,1
PaB670097	21,8	77,9	3,6	6,6
PaB670098	65,9	210,3	3,2	20,0
PaB670099	12,9	62,4	4,8	3,9
PaB670100	20,3	69,0	3,4	6,2
PaB670101	146,9	496,5	3,4	44,5
PaB670102	5,3	13,7	2,6	1,6
PaB670103	27,9	203,5	7,3	8,5
PaB670104	21,7	202,2	9,3	6,6
PaB670105	74,4	495,5	6,7	22,5
PaB670106	312,8	1188,0	3,8	94,8
PaB670107	42,7	463,9	10,9	12,9
PaB670108	29,1	148,6	5,1	8,8

Рекомбинация нескольких гистидиновых остатков в одном scFv

Гистидиновые остатки из scFv, который демонстрировал зависимое от pH связывание в анализе конкуренции *Par0067* за связывание эпитопа, рекомбинировали с применением сайт-направленного мутагенеза (Reikofski J and Tao BY, 1992, *Biotechnol Adv*, 10(4): 535-547). Полученный в результате scFv, который содержал гистидины в двух разных CDR, исследовали в анализе конкурентного связывания как тройного мутанта целого иммуноглобулина G1 (IgG1-ТМ) (табл. 2) для идентификации вариантов с дополнительными улучшениями в отношении зависимого от pH связывания по сравнению с исходным ан-

тителом Par0067.

Выравнивания последовательностей для каждого из модифицированных гистицином клонов по сравнению с последовательностями CDR антитела сравнения Par0067 представлены на фиг. 1А-1В и 2А-2В.

Таблица 2

Клон (IgG)	Анализ конкуренции Par0067 за эпитоп			
	IC ₅₀ (нМ) при pH 7,4	IC ₅₀ (нМ) при pH 6,0	Вариант: Кратность IC ₅₀ (pH 6,0 против pH 7,4)	Кратность IC ₅₀ при pH 7,4 (вариант против Par0067)
Par0067	0,835	0,790	0,95	1,00
PaB670045	2,9	25,8	8,9	3,5
PaB670048	5,7	48,2	8,5	6,8
PaB670128	32,8	IC	ND	39,3
PaB670129	56,1	IC	ND	67,2
PaB670084	10,3	64,6	6,3	12,3
PaB670141	2,4	13,9	5,9	2,8
PaB670142	4,8	67,1	14,0	5,7
PaB670143	3,4	40,0	11,8	4,0
PaB670144	29,0	564,8	19,5	34,7
PaB670146	91,9	784,3	8,5	110,1
PaB670148	48,5	844,6	17,4	58,1
PaB670149	504,9	IC	ND	604,7
PaB670151	69,5	796,0	11,5	83,2
PaB670152	438,8	6604,0	15,1	525,5
PaB670153	93,0	1639,0	17,6	111,4
PaB670156	7,0	190,0	27,2	8,4
PaB670157	15,8	932,4	59,0	18,9
PaB670158	6,8	477,0	69,8	8,2
PaB670159	161,0	IC	ND	192,8
PaB670160	16,9	634,3	37,5	20,2
PaB670161	47,9	1899,0	39,6	57,4
PaB670162	11,4	906,2	79,5	13,7
PaB670163	145,1	IC	ND	173,8

IC = неполная кривая; ND = не показано

Аффинность Fab к PAR2 в отношении PAR2 человека, крысы, макака-крабеда, установленная с помощью BIACORE™

Экспрессировали антигенсвязывающие фрагменты (Fab) антител к PAR2 (Spooner J. et al. (2015) *Bio-otechnol Bioeng.* 112:1472-7) и устанавливали аффинность в отношении рекомбинантного PAR2 разных видов (человека, крысы и макака-крабеда) с помощью Biacore.

Анализ аффинности с помощью Biacore

Аффинность Fab к PAR2 определяли с применением Biacore T100 при 25°C при разных pH (pH 7,4, pH 6,0 и pH 5,6). Эксперименты выполняли с применением рекомбинантного PAR2 человека, крысы и макака-крабеда с N-концевой меткой Avi и C-концевыми метками Flag-His.

Стрептавидин ковалентно иммобилизовали на поверхности чипа C1 с применением стандартных методик иммобилизации по амино-группе при концентрации 4 мкг/мл в 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5. Достигали конечной степени покрытия поверхности стрептавидином, составляющей примерно 30-100 RU. Образцы рекомбинантного биотинилированного PAR2 (полученные на месте) титровали на поверхность чипа со стрептавидином при 4 мкг/мл в буфере HBS-EP+, чтобы обеспечить связывание Fab при насыщении (R_{max}). Этот низкий уровень связывания аналита гарантировал минимальные эффекты массопереноса.

Fab к PAR2 серийно разбавляли (0,39 нМ - 25 нМ) в буфере HBS-EP+, pH 7,4, или в буфере MES-BS-EP+, pH 6,0, или в буфере MES-BS-EP+, pH 5,6, и пропускали по чипу при 50 мкл/мин, с ассоциацией в течение 3 минут и диссоциацией в течение до 30 минут. Несколько введений отдельно буфера осуществляли при таких же условиях, чтобы обеспечить возможность двойного вычитания контроля из конечных наборов сенсограмм, которые анализировали с применением программного обеспечения ViaEval (версия 2.0.1). Поверхность чипа полностью регенерировали с помощью импульсной подачи 4 М MgCl₂.

Результаты определения аффинности с помощью Biacore для отобранных клонов представлены ниже в табл. 3-13.

Таблица 3. Fab Par0067

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	6,66 E+6	4,96 E-5	7,5	50,1
6,0	Человек	3,12 E+6	9,72 E-5	31,2	39,3
7,4	Крыса	5,16 E+6	1,94 E-4	37,6	111
6,0	Крыса	3,21 E+6	5,44 E-4	170	100

Таблица 4. Fab PaB670048

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	4,20 E+6	5,19 E-4	124	69,0
6,0	Человек	1,94 E+6	4,97 E-3	2569	58,3
7,4	Крыса	5,24 E+6	3,07 E-3	586	124,7
6,0	Крыса	4,00 E+6	2,05 E-2	5120	105,2

Таблица 5. Fab PaB670084

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	6,49 E+6	1,62 E-3	250	68,4
6,0	Человек	1,73 E+6	7,63 E-3	4,410	104,6
7,4	Крыса	6,83 E+6	8,37 E-3	1226	97,6
6,0	Крыса	2,57 E+6	2,77 E-2	10,800	91,97

Таблица 6. Fab PaB670076

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	5,84 E+6	1,21 E-3	207	63,5
6,0	Человек	1,11 E+6	5,14 E-3	4,611	99,51
7,4	Крыса	6,34 E+6	1,07 E-2	1,689	87,9
6,0	Крыса	1,66 E+6	5,10 E-2	30,730	82,61

Таблица 7. Fab PaB670120

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	5,54 E+6	1,37 E-3	247	61,62
6,0	Человек	3,48 E+6	2,10 E-2	6,047	94,67
7,4	Крыса	5,62 E+6	1,46 E-2	2,606	84,23
6,0	Крыса	8,26 E+6	0,281	34,040	73,35

Таблица 8. Fab PaB670128

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	5,95 E+6	3,65 E-3	613	59,57
6,0	Человек	2,22 E+6	4,57 E-2	20,062	79,4
7,4	Крыса	6,49 E+6	1,96 E-2	3,023	80,86
6,0	Крыса	1,79 E+6	6,89 E-2	38,520	63,26

Таблица 9. Fah PaB670048

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	5,59 E+6	5,80 E-4	104	58,53
6,0	Человек	1,84 E+6	4,58 E-3	2,488	93,02
7,4	Крыса	7,46 E+6	3,25 E-3	435	81,2
6,0	Крыса	4,84 E+6	2,17 E-2	4,483	80,14

Таблица 10. Fab PaB670129

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	8,20 E+6	5,04 E-3	614	54,98
6,0	Человек	1,59 E+6	5,54 E-2	34,840	76,02
7,4	Крыса	8,82 E+6	2,63 E-2	2,979	73,16
6,0	Крыса	1,45 E+6	8,41 E-2	57,910	67,27

Таблица 11. Fab PaB670136

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	5,17 E+6	4,95 E-3	957	50,27
6,0	Человек	7,92 E+8	14,9	18,840	67,97
7,4	Крыса	7,57 E+6	3,14 E-2	4,149	73,24
6,0	Крыса	1,57 E+6	5,89 E-2	37,550	47,7

Таблица 12. Fab PaB670103

рН	Виды	$k_a (M^{-1} c^{-1})$	$k_d (c^{-1})$	$K_D (пМ)$	Rmax
7,4	Человек	3,52 E+6	1,11 E-4	32,5	46,3
6,0	Человек	3,36 E+5	6,07 E-4	1,805	70,66
7,4	Крыса	3,04 E+6	5,58 E-4	184	74,2
6,0	Крыса	5,31 E+5	5,42 E-3	10,200	69,58

Таблица 13. Fab PaB670129 при 3 разных pH

pH	Виды	K_d ($M^{-1} c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D (nM)	Rmax
7,4	Человек	7,14 E+6	5,34 E-3	747,8	75,9
		6,81 E+6	5,30 E-3	778,0	66,5
6,0	Человек	1,56 E+6	5,76 E-2	36,910	58,1
		3,26 E+6	0,109	33,500	48,4
5,6	Человек	1,33 E+6	0,112	84,550	42,5
7,4	Макак-крабод	6,67 E+6	2,23 E-3	333,3	59,7
		6,59 E+6	2,21 E-3	335,0	51,9
6,0	Макак-крабод	2,14 E+6	2,75 E-2	12,840	49,6
		1,74 E+6	2,36 E-2	13,560	44,2
5,6	Макак-крабод	3,66 E+6	0,139	37,840	41,3

Пример 2. Анализ активности PAR2 и PAR1 на основе клеток

Клетки линии A549 человека, линии KNRK крысы, линии LL/2 мыши или линии CYNOM-K1 макака-крабод, экспрессирующие эндогенный PAR2, или клетки линии 1321N1-hPAR2-c18 человека, сверхэкспрессирующие PAR2 человека, высевали в количестве 5000 (человека, макака-крабод) или 7000 (мыши, крысы) клеток на лунку в покрытые PDL планшеты для культуры тканей (Greiner Bio-One). Клетки нагружали не требующим смывания красителем для кальция Fluo-Screen Quest™ Fluo-8 (AAT Bioquest, Inc). Клетки предварительно обрабатывали с помощью IgG или Fab, разбавленных аналитическим буфером (HBSS, 0,1% BSA, 20 mM HEPES) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для анализов клеток мыши и макака-крабод клетки предварительно обрабатывали с помощью 0,5 нМ или 10 нМ тромбина, соответственно, для десенсибилизации активности PAR1. Кальциевые ответы, опосредованные PAR2, на 11 нМ (человека), 400 нМ (мыши) или 80 нМ (крысы, макака-крабод) трипсина (Polutun) определяли на устройстве для считывания планшетов с помощью визуализации флуоресценции (FLIPR) Tetra (Molecular Devices). Для установления функциональной активности в отношении PAR1 человека устанавливали также управляемые тромбином кальциевые ответы в линии клеток A549 человека на FLIPR Tetra и в этих анализах WEDE15 (Beckman Coulter) и ATAP2 (Life Technologies), представляющие собой нейтрализующие IgG к PAR1, использовали в качестве положительных контролей. Для установления функциональной активности в отношении разнообразных протеаз клетки линии 1321N1-hPAR2-c18, сверхэкспрессирующие PAR2 человека, предварительно обрабатывали с помощью PaB670129 перед стимуляцией высвобождения кальция с помощью 0,5 нМ трипсина, 500 нМ триптазы или 1 нМ матриптазы. Определения флуоресценции выполняли до, во время и после добавления протеазы и рассчитывали пиковые RFU на лунку. Рассчитывали зависимость значений ответов в % (относительно протеазы отдельно) от концентрации антитела и устанавливали значения IC_{50} с применением программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты, полученные для клеток человека, макака-крабод, крысы и мыши в этих анализах представлены на фиг. 3 (A,B,C и D, соответственно), рассчитанные значения IC_{50} для PAR2 - на фиг. 3E и фиг. 6 (данные специфичности PAR1). Расчеты IC_{50} демонстрируют, что PaB670129 эффективно ингибирует индуцированные трипсином кальциевые ответы, опосредованные PAR2, в клетках человека, мыши, крысы и макака-крабод, экспрессирующих эндогенный PAR2 (фиг. 3E). Кроме того, в клетках линии A549 человека индуцированная тромбином активация PAR1 не ингибировалась с помощью PaB670129, но ее можно было эффективно блокировать ворапаксаром и моноклональными антителами к PAR1 (фиг. 6). Эти данные демонстрируют, что PaB670129 является эффективным и специфическим антагонистом PAR2. Применение PaB670129 отдельно в отношении экспрессирующих PAR2 клеток не оказывало эффекта на основные клеточные уровни кальция, что говорит о том, что PaB670129 не обладает агонистической активностью в отношении PAR2 (фиг. 4A). Кроме того, PaB670129 эффективно противодействует индуцированным PAR2 ответам на разнообразные протеазы, в том числе трипсин, триптазу и матриптазу (фиг. 4B).

Анализ кальция в экспрессирующих PAR2 первичных нейронах и глиальных клетках DRG

Получали диссоциированные культуры дорсальных корешковых ганглиев (DRG) детенышей крысы линии Sprague Dawley и выращивали в покрытых ламинином и PDL планшетах для культуры тканей (Greiner Bio-One). Планшеты инкубировали при 37° в течение 24-72 ч перед применением в анализе. Клетки нагружали с помощью 2 мкМ чувствительного к кальцию красителя Fura-2 (Life Technologies). Клетки инкубировали в буфере для визуализации (HBSS, 20 mM HEPES, 0,1 mM сульфинпиразона, 10 мкМ антагониста PAR1, представляющего собой ворапаксар), содержащем антитела к PAR2 в количестве 20 нМ. Затем осуществляли количественное определение внутриклеточного кальция посредством визуализации с помощью Fura-2, основанный на измерении отношений, на микроскопе Olympus IX81, оснащенном ксеноновой дуговой лампой, возбуждающей при 340 и 380 нм, в ответ на применение агонистов, тромбина (Sigma) и матриптазы (R&D Systems), пептида LIGRLO, активирующего PAR2 (SEQ ID NO: 832), (Peptides International) и высокого содержания внеклеточного калия (50 mM). Подсчитывали количество нейронов по сравнению с количеством глиальных клеток в поле зрения (нейроны определяли по демонстрации ответа на высокое содержание калия). Затем рассчитывали суммарное количество чувствительных к матриптазе нейронов и глиальных клеток в поле зрения. Результаты анализа кальция

представлены на фиг. 5A-F и иллюстрируют, что антитело PaB670129 эффективно снижает чувствительность к матриптазе в нейронах (фиг. 5A-C) и отличных от нейронов клетках DRG (фиг. 5D-F).

Пример 3. Эффекты антитела к PAR2 на крысиной модели боли при воспалении суставов

Внутриартикулярное введение йодацетата мононатрия (MIA) в ипсилатеральное колено крыс линии Sprague Dawley приводило к развитию сильной и длительной гипералгезии и аллодинии, первоначально связанных с воспалительным ответом. Считается, что развитие этих признаков в этой животной модели является клинически значимым, при этом отражает симптомы, проявляющиеся у пациентов с хронической болью, вызванной воспалением, связанной с такими основными состояниями, как остеоартрит (ОА) или ревматоидный артрит (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Kalbhen 1987). Ранее было продемонстрировано, что (с применением весовой нагрузки в качестве конечной точки) временная динамика индуцированной MIA гипералгезии следует двухфазному паттерну с ранним, преимущественно воспалительным компонентом, который чувствителен к Cox-2, и заметно снижается с помощью общепринятого стандарта, представляющего собой целекоксиб. Эта ранняя воспалительная фаза сменяется более хроническим болевым фенотипом, который чувствителен к прегабалину (PGB) и нечувствителен к целекоксибу, что указывает на наличие основного компонента более нейропатического типа.

Весовая нагрузка

Не получавшие лечение крысы равномерно распределяют вес тела между двумя задними лапами. Однако, когда инъекционное (левое) заднее колено воспалено и/или болит, вес перераспределяется так, чтобы на пораженную конечность ложился меньший вес (уменьшение весовой нагрузки на поврежденную конечность).

Весовую нагрузку на каждую заднюю конечность определяют с помощью устройства измерения недееспособности крыс (Linton Instruments, Великобритания).

Крыс линии Sprague Dawley помещали в устройство для измерения неспособности задними лапами на отдельные датчики и регистрировали среднее усилие, прикладываемое обеими задними конечностями, в течение 4 с.

Процедура

После доставки крысы проходили минимальный период привыкания в течение 7 дней до начала исследования. Не получавших лечение крыс акклиматизировали в процедурной комнате в их домашних клетках, с едой и водой, доступными в неограниченном количестве. Привыкания к камере весовой нагрузки осуществляли в течение нескольких дней. Исходные данные весовой нагрузки учитывали в последний день.

В день 0 после учета конечных исходных данных животных анестезировали с применением изофлурана и кислорода, смешанных 3:1 в стерильных условиях. Область левого колена выбривали и очищали разбавленным раствором гибискраба.

Остеоартрит (ОА) индуцировали инъекцией раствора MIA (Sigma, I2512), 25 мкл с концентрацией 80 мг/мл, (2 мг) в коленный сустав левой задней ноги. Ложнооперированным животным вводили инъекцию солевого раствора. Обеспечивали восстановление животных в теплой среде, а затем возвращали в их домашнюю клетку.

У животных развивалась воспалительная реакция после MIA, и они могли оберегать и вылизывать пораженный участок. Поэтому крыс тщательно контролировали на наличие неожиданных признаков дистресса или сильной боли, чтобы любое животное с такими признаками могло быть немедленно выбраковано.

Животных взвешивали ежедневно в течение первой недели, а затем каждые несколько дней. Весовую нагрузку оценивали в дни 3, 7, 10 и 14 после инъекции MIA на предмет развития хронической боли. В день 18 проводили определения весовой нагрузки, животных ранжировали и рандомизировали по группам лечения в соответствии с их окном MIA в схеме латинского квадрата.

Режим введения дозы антитела

Животных обрабатывали с помощью Pa0067 (PAR2 + ve) 10 мг/кг или изотипического контроля (PAR2 - ve) 10 мг/кг в/в в день 18, а затем проводили определения весовой нагрузки через 4 ч и 1, 2, 6, 8, 10 и 14 дней после введения дозы антитела.

Режим введения дозы прегабалина и целекоксиба

Животным вводили дозу PGB (30 мг/кг п/о; 2 мл/кг) или целекоксиба (50 мг/кг п/о; 2 мл/кг) ежедневно в дни 24, 25, 26, 27 и 28 после инъекции MIA. Оценки весовой нагрузки выполняли через 1 ч после введения дозы в дни 24, 26 и 28, а дальнейшие данные получали после прекращения медикаментозного лечения в день 32.

В дни 1, 2, 6, 10 и 14 после введения дозы, после оценивания весовой нагрузки через хвостовую вену отбирали 400 мкл крови для фармакокинетического анализа обработанных антителом и изотипическим контролем групп (n = 5/группа).

Оценка исследования

Показания весовой нагрузки (г) получали и для правой, и для левой задних лап и рассчитывали разницу. Данные выражали в виде отношения ипсилатеральная лапа/контралатеральная лапа в % ((WB слева/WB справа)*100) (среднее \pm s.e.m.).

Расчет

Показания ипсилатеральной лапы/показания контралатеральной лапы $\times 100$. Диапазон от значения разницы WB для животных, не получавших лечение до значения разницы WB при измерении до введения дозы определяли как окно MIA.

Статистический анализ ANOVA для повторяющихся измерений с последующим применением критерия плановых сравнений с применением InVivoStat (invivostat.co.uk) ($p < 0,05$ считали значимым). Данные анализировали путем сравнения групп обработки с контрольной группой, получавшей средуноситель, в каждый момент времени.

Инъекция 2 мг МИА в коленный сустав вызвала заметную реакцию воспаления и гиперчувствительности, очевидную со дня 3, что выявляли по смещению весовой нагрузки между пораженной и неповрежденной задними лапами. Этот индуцированный МИА гиперактивный ответ все еще был очевиден во всех группах вплоть до дня 18 (и далее для контрольных животных, получавших средуноситель), в который вводили первые исследуемые средства. Инъекция солевого раствора не влияла на весовую нагрузку.

Как показано на фиг. 7А, значительное и выраженное купирование гиперчувствительности наблюдали после ежедневного введения прегабалина (30 мг/кг) с дня 24-28 со слабым остаточным эффектом, все еще проявляющимся после предшествующего прекращения лечения в день 32. Напротив, при ежедневном введении цеlexоксифа (50 мг/кг) с дня 24-28 в лучшем случае показано только слабое купирование гиперчувствительности. Этот фармакологический профиль показывает, что гиперактивность, наблюдаемая во время этой фазы ответа на МИА, носит преимущественно нейропатический, а не воспалительный характер.

Как также показано на фиг. 7А, значительное купирование гиперчувствительности наблюдалось при применении Par0067 через 4 ч после введения дозы до дня 28 (10 дней после введения дозы). Никакого эффекта не наблюдали с изотипическим контролем в течение того же периода времени. На фиг. 7В проиллюстрирован эффект обработки различными концентрациями Par0067.

Пример 4. Эффект антитела к PAR2, представляющего собой РаВ670129, в отношении купирования механической гипералгезии, индуцированной частичным лигированием нерва, у самок мышей линии C57BL/6

Введение

Частичное лигирование седалищного нерва (PNL), как описано Seltzer (1990), является одной из ряда моделей лигирования нерва, которые, как сообщается, служат доклиническими моделями нейропатической боли. Оно вызывает глубокую механическую гипералгезию, уровень которой можно определить с помощью анальгезиметра, как описано Randall и Selitto (1957). В этом примере описываются эффекты введения РаВ670129, представляющего собой антитело к PAR2, на гипералгезию в этой модели повреждения нерва/нейропатической боли.

Процедура

Шестьдесят самок мышей линии C57BL/6 подвергали введению транспондеров для целей идентификации по меньшей мере за 5 дней до начала исследования. Уровень механической гипералгезии устанавливали с применением анальгезиметра (Randall & Selitto 1957) (Ugo Basile). Возрастающую силу применяли к дорсальной поверхности каждой задней лапы по очереди до тех пор, пока не наблюдали ответа отдергивания. В этот момент применение силы останавливали и записывали вес в граммах. Данные выражали в виде порога отдергивания в граммах для ипсилатеральной и контралатеральной лап. После установления исходного уровня показаний мышей делили на 2 группы с примерно равным соотношением порога отдергивания для ипсилатеральной/контралатеральной лапы, которых подвергали хирургической операции по частичному лигированию седалищного нерва или использовали в качестве ложнооперированных контролей. Во время операции мышью анестезировали изофлураном. После этого примерно 1 см левого седалищного нерва подвергали тупой диссекции через разрез на уровне середины бедра. Шовный материал (8/0 Virgin Silk; Ethicon) затем пропускали через дорсальную треть нерва и туго завязывали. Затем разрез закрывали с помощью клея и мышам обеспечивали возможность восстановления в течение по меньшей мере шести дней перед началом исследования. Ложнооперированные мыши проходили обработку по тому же протоколу, но после обнажения нерва мышам накладывали швы и обеспечивали возможность восстановления.

Мышей исследовали в отношении возникновения гипералгезии в дни 7 и 10 после операции. Любые мыши, у которых наблюдали соотношение порога одергивания ипсилатеральной/контралатеральной лапы больше 80%, классифицировали как не отвечающих и удаляли из исследования. После исследования в день 10 мышью дополнительно подразделяли на группы с получением окончательных групп обработки;

- А. Группа 1: Ложнооперированное животное + изотипический контроль 10 мг/кг п/к (N = 10)
- В. Группа 2: Лигирование нерва + изотипический контроль 10 мг/кг п/к (N = 9)
- С. Группа 3: Лигирование нерва + этанерцепт 0,3 мг/кг п/к (N = 9)
- Д. Группа 4: Лигирование нерва + РаВ670129 3 мг/кг п/к (N = 9)
- Е. Группа 5: Лигирование нерва + РаВ670129 10 мг/кг п/к (N = 9)

Ф. Группа 6: Лигирование нерва + РаВ670129 50 мг/кг п/к (N = 9)

Мышам вводили контроль или исследуемые молекулы, разбавленные в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), в день 13 и повторно исследовали на предмет изменений уровня механической гипералгезии через 4 часа после введения дозы, а также в дни 1, 2, 4 и 7 после введения дозы.

Анализ данных

Показатели ипсилатеральной лапы и контралатеральной лапы получали для каждого животного в каждый момент времени исследования. Весовую нагрузку на ипсилатеральную и контралатеральную задние конечности выражали в виде отношения и данные группы анализировали (PRISM) с применением 2-факторного ANOVA и попарных сравнений, при этом соответствие определяли с применением критерия Тьюки.

Результаты

Частичное лигирование седалищного нерва вызывало механическую гипералгезию, которая проявлялась в виде значительного снижения соотношения порога отдергивания ипсилатеральной/контралатеральной лапы в день 7 и 10 по сравнению с таковым у ложнопериоперированных контролей. После обработки изотипическим контролем у оперированных мышей не показано никаких изменений в уровне механической гипералгезии относительно уровней до введения дозы, что указывает на отсутствие эффекта. Введение внутреннего общепринятого стандарта, представляющего собой этанерцепта (0,3 мг/кг п/к), вызывало значительное купирование гипералгезии от 4 часов до 7 дней после введения дозы, что соответствовало результатам предыдущих исследований. РаВ670129 вызывало купирование, представленное в виде отношения значений для ипсилатеральной лапы/контралатеральной лапы, в зависимости от дозы, при этом пиковые эффекты наблюдали как при 10 мг/кг, так и при 50 мг/кг. Наиболее низкая доза 3 мг/кг, которая хотя и являлась значимой через 1, 2 и 7 дней после введения дозы, показала меньший эффект (см. фиг. 8).

Частичное лигирование седалищного нерва вызывало длительную механическую гипералгезию, что соответствовало ранее сообщенным результатам. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что это служит доклиническим коррелятом боли, наблюдаемой при нейропатической боли. Введение РаВ670129 показало значительное и связанное с дозой купирование этой гипералгезии, что указывает на потенциал применения антител к PAR2 в лечении нейропатической боли.

Библиография

- Persic, L. et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 187, 9-18 (1997).
- Reikofski J and Tao BY (1992) Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol Adv*, 10(4): 535-547.
- Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11 (11): 821-30. eng.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004; 112 (1-2): 83-93. eng.
- Kalbhen DA. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol* 1987; 14 Spec No: 130-1. eng.

- Clark RA, Shoaib M, Hewitt KN, Stanford SC, Bate ST (2012)., A comparison of InVivoStat with other statistical software packages for analysis of data generated from animal experiments, *J Psychopharmacology*, 26(8), 1136-1142.
- Myska Improving Biosensor Analysis. *Journal of Molecular Recognition*. 1999
- D.G. Myska Improving Biosensor Analysis. *Journal of Molecular Recognition*. 1999;12 : 279-284.
- Myska DG, Improving Biosensor Analysis. *Journal of Molecular Recognition*. 1999; 12: 279-284.
- A.W. Drake, M.L. Tang, G.A. Papalia, G. Landes, M. Haak-Frendscho, S.L. Klakamp, Biacore surface matrix effects on the binding kinetics and affinity of an antigen/antibody complex, *Anal. Biochem*. 429 (2012) 58-69
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grisley G and Grey T, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci*. 1995; 4: 2411-2423.
- Spooner J, Keen J, Nayyar K, Birkett N, Bond N, Bannister D, Tigue N, Higazi D, Kemp B, Vaughan T, Kippen A, Buchanan A. (2015) Evaluation of strategies to control Fab light chain dimer during mammalian expression and purification: A universal one-step process for purification of correctly assembled Fab. *Biotechnol Bioeng*. 112:1472-7.
- Daramola O, Stevenson J, Dean G, Hatton D, Pettman G, Holmes W, Field R (2014) A high yielding CHO transient system: co-expression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression. *Biotechnol Prog*. 30(1):132-41.
- Mach H, Middaugh CR, Lewis RV (1992) Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal. Biochem*. 200(1):74-80.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218
- Randall LO, Selitto JJ (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 111(4): 409-419

Перечень последовательностей PRT = аминокислотная последовательность

SEQ ID NO:	Название клона	Тип
1	ZZ15D2-D02 (Par0067)	ДНК VH
2	ZZ15D2-D02 (Par0067)	PRT VH
3	ZZ15D2-D02 (Par0067)	PRT CDR1
4	ZZ15D2-D02 (Par0067)	PRT CDR2
5	ZZ15D2-D02 (Par0067)	PRT CDR3
6	ZZ15D2-D02 (Par0067)	ДНК VL
7	ZZ15D2-D02 (Par0067)	PRT VL
8	ZZ15D2-D02 (Par0067)	PRT CDR1
9	ZZ15D2-D02 (Par0067)	PRT CDR2

044850

10	ZZ15D2-D02 (PaR0067)	PRT CDR3
11	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	ДHK VH
12	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT VH
13	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT CDR1
14	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT CDR2
15	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT CDR3
16	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	ДHK VL
17	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT VL
18	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT CDR1
19	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT CDR2
20	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	PRT CDR3
21	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	ДHK VH
22	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT VH
23	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT CDR1
24	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT CDR2
25	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT CDR3
26	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	ДHK VL
27	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT VL
28	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT CDR1
29	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT CDR2
30	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	PRT CDR3
31	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	ДHK VH
32	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT VH
33	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT CDR1
34	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT CDR2
35	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT CDR3
36	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	ДHK VL
37	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT VL
38	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT CDR1
39	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT CDR2
40	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	PRT CDR3
41	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	ДHK VH
42	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT VH
43	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT CDR1
44	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT CDR2
45	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT CDR3
46	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	ДHK VL
47	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT VL
48	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT CDR1
49	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT CDR2
50	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	PRT CDR3
51	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	ДHK VH
52	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT VH
53	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT CDR1

044850

54	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT CDR2
55	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT CDR3
56	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	ДНК VL
57	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT VL
58	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT CDR1
59	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT CDR2
60	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	PRT CDR3
61	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	ДНК VH
62	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT VH
63	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT CDR1
64	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT CDR2
65	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT CDR3
66	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	ДНК VL
67	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT VL
68	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT CDR1
69	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT CDR2
70	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	PRT CDR3
71	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	ДНК VH
72	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT VH
73	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT CDR1
74	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT CDR2
75	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT CDR3
76	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	ДНК VL
77	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT VL
78	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT CDR1
79	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT CDR2
80	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	PRT CDR3
81	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	ДНК VH
82	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT VH
83	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT CDR1
84	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT CDR2
85	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT CDR3
86	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	ДНК VL
87	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT VL
88	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT CDR1
89	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT CDR2
90	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	PRT CDR3
91	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	ДНК VH
92	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT VH
93	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT CDR1
94	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT CDR2
95	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT CDR3
96	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	ДНК VL
97	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT VL

044850

98	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT CDR1
99	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT CDR2
100	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	PRT CDR3
101	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	ДHK VH
102	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT VH
103	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT CDR1
104	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT CDR2
105	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT CDR3
106	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	ДHK VL
107	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT VL
108	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT CDR1
109	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT CDR2
110	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	PRT CDR3
111	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	ДHK VH
112	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT VH
113	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT CDR1
114	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT CDR2
115	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT CDR3
116	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	ДHK VL
117	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT VL
118	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT CDR1
119	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT CDR2
120	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	PRT CDR3
121	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	ДHK VH
122	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT VH
123	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT CDR1
124	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT CDR2
125	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT CDR3
126	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	ДHK VL
127	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT VL
128	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT CDR1
129	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT CDR2
130	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	PRT CDR3
131	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	ДHK VH
132	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT VH
133	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT CDR1
134	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT CDR2
135	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT CDR3
136	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	ДHK VL
137	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT VL
138	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT CDR1
139	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT CDR2
140	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	PRT CDR3
141	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	ДHK VH

142	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT VH
143	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT CDR1
144	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT CDR2
145	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT CDR3
146	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	ДHK VL
147	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT VL
148	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT CDR1
149	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT CDR2
150	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	PRT CDR3
151	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	ДHK VH
152	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT VH
153	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT CDR1
154	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT CDR2
155	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT CDR3
156	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	ДHK VL
157	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT VL
158	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT CDR1
159	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT CDR2
160	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	PRT CDR3
161	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	ДHK VH
162	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT VH
163	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT CDR1
164	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT CDR2
165	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT CDR3
166	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	ДHK VL
167	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT VL
168	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT CDR1
169	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT CDR2
170	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	PRT CDR3
171	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	ДHK VH
172	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT VH
173	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT CDR1
174	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT CDR2
175	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT CDR3
176	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	ДHK VL
177	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT VL
178	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT CDR1
179	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT CDR2
180	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	PRT CDR3
181	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	ДHK VH
182	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT VH
183	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT CDR1
184	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT CDR2
185	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT CDR3

186	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	ДHK VL
187	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT VL
188	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT CDR1
189	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT CDR2
190	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	PRT CDR3
191	PaB670080	ДHK VH
192	PaB670080	PRT VH
193	PaB670080	PRT CDR1
194	PaB670080	PRT CDR2
195	PaB670080	PRT CDR3
196	PaB670080	ДHK VL
197	PaB670080	PRT VL
198	PaB670080	PRT CDR1
199	PaB670080	PRT CDR2
200	PaB670080	PRT CDR3
201	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	ДHK VH
202	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT VH
203	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT CDR1
204	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT CDR2
205	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT CDR3
206	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	ДHK VL
207	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT VL
208	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT CDR1
209	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT CDR2
210	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	PRT CDR3
211	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	ДHK VH
212	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT VH
213	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT CDR1
214	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT CDR2
215	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT CDR3
216	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	ДHK VL
217	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT VL
218	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT CDR1
219	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT CDR2
220	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	PRT CDR3
221	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	ДHK VH
222	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT VH
223	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT CDR1
224	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT CDR2
225	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT CDR3
226	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	ДHK VL
227	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT VL
228	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT CDR1
229	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT CDR2

230	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	PRT CDR3
231	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	ДHK VH
232	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT VH
233	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT CDR1
234	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT CDR2
235	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT CDR3
236	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	ДHK VL
237	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT VL
238	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT CDR1
239	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT CDR2
240	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	PRT CDR3
241	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	ДHK VH
242	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT VH
243	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT CDR1
244	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT CDR2
245	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT CDR3
246	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	ДHK VL
247	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT VL
248	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT CDR1
249	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT CDR2
250	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	PRT CDR3
251	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	ДHK VH
252	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT VH
253	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT CDR1
254	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT CDR2
255	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT CDR3
256	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	ДHK VL
257	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT VL
258	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT CDR1
259	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT CDR2
260	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	PRT CDR3
261	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	ДHK VH
262	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT VH
263	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT CDR1
264	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT CDR2
265	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT CDR3
266	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	ДHK VL
267	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT VL
268	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT CDR1
269	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT CDR2
270	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	PRT CDR3
271	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	ДHK VH
272	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT VH
273	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT CDR1

274	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT CDR2
275	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT CDR3
276	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	ДНК VL
277	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT VL
278	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT CDR1
279	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT CDR2
280	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	PRT CDR3
281	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	ДНК VH
282	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT VH
283	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT CDR1
284	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT CDR2
285	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT CDR3
286	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	ДНК VL
287	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT VL
288	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT CDR1
289	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT CDR2
290	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	PRT CDR3
291	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	ДНК VH
292	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT VH
293	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT CDR1
294	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT CDR2
295	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT CDR3
296	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	ДНК VL
297	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT VL
298	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT CDR1
299	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT CDR2
300	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	PRT CDR3
301	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	ДНК VH
302	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT VH
303	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT CDR1
304	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT CDR2
305	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT CDR3
306	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	ДНК VL
307	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT VL
308	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT CDR1
309	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT CDR2
310	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	PRT CDR3
311	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	ДНК VH
312	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT VH
313	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT CDR1
314	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT CDR2
315	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT CDR3
316	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	ДНК VL
317	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT VL

044850

318	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT CDR1
319	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT CDR2
320	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	PRT CDR3
321	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	ДHK VH
322	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT VH
323	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT CDR1
324	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT CDR2
325	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT CDR3
326	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	ДHK VL
327	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT VL
328	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT CDR1
329	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT CDR2
330	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	PRT CDR3
331	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	ДHK VH
332	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT VH
333	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT CDR1
334	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT CDR2
335	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT CDR3
336	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	ДHK VL
337	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT VL
338	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT CDR1
339	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT CDR2
340	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	PRT CDR3
341	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	ДHK VH
342	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT VH
343	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT CDR1
344	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT CDR2
345	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT CDR3
346	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	ДHK VL
347	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT VL
348	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT CDR1
349	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT CDR2
350	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	PRT CDR3
351	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	ДHK VH
352	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT VH
353	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT CDR1
354	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT CDR2
355	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT CDR3
356	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	ДHK VL
357	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT VL
358	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT CDR1
359	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT CDR2
360	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	PRT CDR3
361	PaB670099	ДHK VH

362	PaB670099	PRT VH
363	PaB670099	PRT CDR1
364	PaB670099	PRT CDR2
365	PaB670099	PRT CDR3
366	PaB670099	ДНК VL
367	PaB670099	PRT VL
368	PaB670099	PRT CDR1
369	PaB670099	PRT CDR2
370	PaB670099	PRT CDR3
371	PaB670100	ДНК VH
372	PaB670100	PRT VH
373	PaB670100	PRT CDR1
374	PaB670100	PRT CDR2
375	PaB670100	PRT CDR3
376	PaB670100	ДНК VL
377	PaB670100	PRT VL
378	PaB670100	PRT CDR1
379	PaB670100	PRT CDR2
380	PaB670100	PRT CDR3
381	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	ДНК VH
382	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT VH
383	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT CDR1
384	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT CDR2
385	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT CDR3
386	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	ДНК VL
387	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT VL
388	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT CDR1
389	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT CDR2
390	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	PRT CDR3
391	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	ДНК VH
392	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT VH
393	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT CDR1
394	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT CDR2
395	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT CDR3
396	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	ДНК VL
397	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT VL
398	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT CDR1
399	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT CDR2
400	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	PRT CDR3
401	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	ДНК VH
402	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT VH
403	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT CDR1
404	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT CDR2
405	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT CDR3

044850

406	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	ДHK VL
407	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT VL
408	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT CDR1
409	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT CDR2
410	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	PRT CDR3
411	PaB670104	ДHK VH
412	PaB670104	PRT VH
413	PaB670104	PRT CDR1
414	PaB670104	PRT CDR2
415	PaB670104	PRT CDR3
416	PaB670104	ДHK VL
417	PaB670104	PRT VL
418	PaB670104	PRT CDR1
419	PaB670104	PRT CDR2
420	PaB670104	PRT CDR3
421	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	ДHK VH
422	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT VH
423	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT CDR1
424	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT CDR2
425	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT CDR3
426	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	ДHK VL
427	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT VL
428	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT CDR1
429	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT CDR2
430	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	PRT CDR3
431	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	ДHK VH
432	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT VH
433	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT CDR1
434	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT CDR2
435	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT CDR3
436	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	ДHK VL
437	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT VL
438	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT CDR1
439	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT CDR2
440	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	PRT CDR3
441	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	ДHK VH
442	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT VH
443	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT CDR1
444	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT CDR2
445	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT CDR3
446	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	ДHK VL
447	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT VL
448	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT CDR1
449	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT CDR2

450	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	PRT CDR3
451	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	ДНК VH
452	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT VH
453	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT CDR1
454	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT CDR2
455	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT CDR3
456	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	ДНК VL
457	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT VL
458	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT CDR1
459	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT CDR2
460	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	PRT CDR3
461	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	ДНК VH
462	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT VH
463	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT CDR1
464	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT CDR2
465	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT CDR3
466	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	ДНК VL
467	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT VL
468	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT CDR1
469	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT CDR2
470	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	PRT CDR3
471	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	ДНК VH
472	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT VH
473	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT CDR1
474	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT CDR2
475	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT CDR3
476	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	ДНК VL
477	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT VL
478	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT CDR1
479	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT CDR2
480	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	PRT CDR3
481	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	ДНК VH
482	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT VH
483	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT CDR1
484	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT CDR2
485	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT CDR3
486	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	ДНК VL
487	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT VL
488	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT CDR1
489	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT CDR2
490	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	PRT CDR3
491	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	ДНК VH
492	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT VH
493	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT CDR1

494	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT CDR2
495	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT CDR3
496	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	ДНК VL
497	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT VL
498	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT CDR1
499	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT CDR2
500	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	PRT CDR3
501	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	ДНК VH
502	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT VH
503	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT CDR1
504	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT CDR2
505	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT CDR3
506	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	ДНК VL
507	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT VL
508	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT CDR1
509	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT CDR2
510	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	PRT CDR3
511	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	ДНК VH
512	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT VH
513	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT CDR1
514	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT CDR2
515	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT CDR3
516	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	ДНК VL
517	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT VL
518	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT CDR1
519	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT CDR2
520	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	PRT CDR3
521	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	ДНК VH
522	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT VH
523	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT CDR1
524	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT CDR2
525	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT CDR3
526	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	ДНК VL
527	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT VL
528	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT CDR1
529	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT CDR2
530	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	PRT CDR3
531	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	ДНК VH
532	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT VH
533	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT CDR1
534	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT CDR2
535	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT CDR3
536	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	ДНК VL
537	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT VL

538	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT CDR1
539	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT CDR2
540	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	PRT CDR3
541	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	ДHK VH
542	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT VH
543	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT CDR1
544	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT CDR2
545	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT CDR3
546	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	ДHK VL
547	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT VL
548	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT CDR1
549	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT CDR2
550	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	PRT CDR3
551	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	ДHK VH
552	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT VH
553	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT CDR1
554	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT CDR2
555	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT CDR3
556	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	ДHK VL
557	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT VL
558	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT CDR1
559	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT CDR2
560	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	PRT CDR3
561	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	ДHK VH
562	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT VH
563	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT CDR1
564	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT CDR2
565	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT CDR3
566	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	ДHK VL
567	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT VL
568	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT CDR1
569	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT CDR2
570	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	PRT CDR3
571	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	ДHK VH
572	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT VH
573	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT CDR1
574	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT CDR2
575	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT CDR3
576	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	ДHK VL
577	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT VL
578	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT CDR1
579	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT CDR2
580	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	PRT CDR3
581	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	ДHK VH

044850

582	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT VH
583	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT CDR1
584	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT CDR2
585	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT CDR3
586	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	ДHK VL
587	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT VL
588	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT CDR1
589	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT CDR2
590	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	PRT CDR3
591	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	ДHK VH
592	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT VH
593	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT CDR1
594	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT CDR2
595	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT CDR3
596	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	ДHK VL
597	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT VL
598	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT CDR1
599	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT CDR2
600	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	PRT CDR3
601	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	ДHK VH
602	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT VH
603	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT CDR1
604	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT CDR2
605	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT CDR3
606	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	ДHK VL
607	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT VL
608	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT CDR1
609	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT CDR2
610	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	PRT CDR3
611	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	ДHK VH
612	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT VH
613	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT CDR1
614	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT CDR2
615	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT CDR3
616	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	ДHK VL
617	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT VL
618	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT CDR1
619	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT CDR2
620	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	PRT CDR3
621	PaB670141	ДHK VH
622	PaB670141	PRT VH
623	PaB670141	PRT CDR1
624	PaB670141	PRT CDR2
625	PaB670141	PRT CDR3

626	PaB670141	ДНК VL
627	PaB670141	PRT VL
628	PaB670141	PRT CDR1
629	PaB670141	PRT CDR2
630	PaB670141	PRT CDR3
631	PaB670142	ДНК VH
632	PaB670142	PRT VH
633	PaB670142	PRT CDR1
634	PaB670142	PRT CDR2
635	PaB670142	PRT CDR3
636	PaB670142	ДНК VL
637	PaB670142	PRT VL
638	PaB670142	PRT CDR1
639	PaB670142	PRT CDR2
640	PaB670142	PRT CDR3
641	PaB670143	ДНК VH
642	PaB670143	PRT VH
643	PaB670143	PRT CDR1
644	PaB670143	PRT CDR2
645	PaB670143	PRT CDR3
646	PaB670143	ДНК VL
647	PaB670143	PRT VL
648	PaB670143	PRT CDR1
649	PaB670143	PRT CDR2
650	PaB670143	PRT CDR3
651	PaB670144	ДНК VH
652	PaB670144	PRT VH
653	PaB670144	PRT CDR1
654	PaB670144	PRT CDR2
655	PaB670144	PRT CDR3
656	PaB670144	ДНК VL
657	PaB670144	PRT VL
658	PaB670144	PRT CDR1
659	PaB670144	PRT CDR2
660	PaB670144	PRT CDR3
661	PaB670146	ДНК VH
662	PaB670146	PRT VH
663	PaB670146	PRT CDR1
664	PaB670146	PRT CDR2
665	PaB670146	PRT CDR3
666	PaB670146	ДНК VL
667	PaB670146	PRT VL
668	PaB670146	PRT CDR1
669	PaB670146	PRT CDR2

670	PaB670146	PRT CDR3
671	PaB670148	ДHK VH
672	PaB670148	PRT VH
673	PaB670148	PRT CDR1
674	PaB670148	PRT CDR2
675	PaB670148	PRT CDR3
676	PaB670148	ДHK VL
677	PaB670148	PRT VL
678	PaB670148	PRT CDR1
679	PaB670148	PRT CDR2
680	PaB670148	PRT CDR3
681	PaB670149	ДHK VH
682	PaB670149	PRT VH
683	PaB670149	PRT CDR1
684	PaB670149	PRT CDR2
685	PaB670149	PRT CDR3
686	PaB670149	ДHK VL
687	PaB670149	PRT VL
688	PaB670149	PRT CDR1
689	PaB670149	PRT CDR2
690	PaB670149	PRT CDR3
691	PaB670151	ДHK VH
692	PaB670151	PRT VH
693	PaB670151	PRT CDR1
694	PaB670151	PRT CDR2
695	PaB670151	PRT CDR3
696	PaB670151	ДHK VL
697	PaB670151	PRT VL
698	PaB670151	PRT CDR1
699	PaB670151	PRT CDR2
700	PaB670151	PRT CDR3
701	PaB670152	ДHK VH
702	PaB670152	PRT VH
703	PaB670152	PRT CDR1
704	PaB670152	PRT CDR2
705	PaB670152	PRT CDR3
706	PaB670152	ДHK VL
707	PaB670152	PRT VL
708	PaB670152	PRT CDR1
709	PaB670152	PRT CDR2
710	PaB670152	PRT CDR3
711	PaB670153	ДHK VH
712	PaB670153	PRT VH
713	PaB670153	PRT CDR1

714	PaB670153	PRT CDR2
715	PaB670153	PRT CDR3
716	PaB670153	ДНК VL
717	PaB670153	PRT VL
718	PaB670153	PRT CDR1
719	PaB670153	PRT CDR2
720	PaB670153	PRT CDR3
721	PaB670156	ДНК VH
722	PaB670156	PRT VH
723	PaB670156	PRT CDR1
724	PaB670156	PRT CDR2
725	PaB670156	PRT CDR3
726	PaB670156	ДНК VL
727	PaB670156	PRT VL
728	PaB670156	PRT CDR1
729	PaB670156	PRT CDR2
730	PaB670156	PRT CDR3
731	PaB670157	ДНК VH
732	PaB670157	PRT VH
733	PaB670157	PRT CDR1
734	PaB670157	PRT CDR2
735	PaB670157	PRT CDR3
736	PaB670157	ДНК VL
737	PaB670157	PRT VL
738	PaB670157	PRT CDR1
739	PaB670157	PRT CDR2
740	PaB670157	PRT CDR3
741	PaB670158	ДНК VH
742	PaB670158	PRT VH
743	PaB670158	PRT CDR1
744	PaB670158	PRT CDR2
745	PaB670158	PRT CDR3
746	PaB670158	ДНК VL
747	PaB670158	PRT VL
748	PaB670158	PRT CDR1
749	PaB670158	PRT CDR2
750	PaB670158	PRT CDR3
751	PaB670159	ДНК VH
752	PaB670159	PRT VH
753	PaB670159	PRT CDR1
754	PaB670159	PRT CDR2
755	PaB670159	PRT CDR3
756	PaB670159	ДНК VL
757	PaB670159	PRT VL

044850

758	PaB670159	PRT CDR1
759	PaB670159	PRT CDR2
760	PaB670159	PRT CDR3
761	PaB670160	ДНК VH
762	PaB670160	PRT VH
763	PaB670160	PRT CDR1
764	PaB670160	PRT CDR2
765	PaB670160	PRT CDR3
766	PaB670160	ДНК VL
767	PaB670160	PRT VL
768	PaB670160	PRT CDR1
769	PaB670160	PRT CDR2
770	PaB670160	PRT CDR3
771	PaB670161	ДНК VH
772	PaB670161	PRT VH
773	PaB670161	PRT CDR1
774	PaB670161	PRT CDR2
775	PaB670161	PRT CDR3
776	PaB670161	ДНК VL
777	PaB670161	PRT VL
778	PaB670161	PRT CDR1
779	PaB670161	PRT CDR2
780	PaB670161	PRT CDR3
781	PaB670162	ДНК VH
782	PaB670162	PRT VH
783	PaB670162	PRT CDR1
784	PaB670162	PRT CDR2
785	PaB670162	PRT CDR3
786	PaB670162	ДНК VL
787	PaB670162	PRT VL
788	PaB670162	PRT CDR1
789	PaB670162	PRT CDR2
790	PaB670162	PRT CDR3
791	PaB670163	ДНК VH
792	PaB670163	PRT VH
793	PaB670163	PRT CDR1
794	PaB670163	PRT CDR2
795	PaB670163	PRT CDR3
796	PaB670163	ДНК VL
797	PaB670163	PRT VL
798	PaB670163	PRT CDR1
799	PaB670163	PRT CDR2
800	PaB670163	PRT CDR3

SEQ ID NO: 801- Препротенин PAR2 человека (учетный номер в GenBank NP_005233.3)

MRSPSAAWLLGAAILLAASLSCSGTIQGTNRSSKGRSLIGKVDGTSHVTGKGV
TVETVFSVDEFSASVLTGKLTTVFLPIVYTVFVVGLPSNGMALWVFLFRTKKKHPAV
IYMANLALADLLSVIWFPLKIAYHIHGNNWIYGEALCNVLIGFFYGNMYCSILFMTCL
SVQRYWVIVNPMGHSRKKANIAIGISLAIWLLLLVTIPLYVVKQTIFIPALNITTCHDV
LPEQLLVGDMFNFLSLAIGVFLFPAFLTASAYVLMIRMLRSSAMDENSEKKRRAIK
LIVTVLAMYLICFTPSNLLL VVHYFLIKSQGQSHVYALYIVALCLSTLNSCIDPFVYYF
VSHDFRDHAKNALLCRSVRTVKMQVSLTSKKHSRKSSESSSSTTVKTSY

SEQ ID NO: 802- Привязанный лиганд PAR2 человека
SLIGKVDGTSHVTGKGVTVETVFSVDEFSASVLTGKLT

SEQ ID NO: 803- Иллюстративная каркасная область 1 VH
EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFS

SEQ ID NO: 804- Иллюстративная каркасная область 2 VH
WVRQAPGKGLEWVS

SEQ ID NO: 805- Иллюстративная каркасная область 3 VH
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

SEQ ID NO: 806- Иллюстративная каркасная область 4 VH
WGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 807- Иллюстративная каркасная область 1 VL
SIELTQPPSVSVSPGQTASITC

SEQ ID NO: 808- Иллюстративная каркасная область 2 VL
WYQQKPGQSPVLVIY

SEQ ID NO: 809- Иллюстративная каркасная область 3 VL
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

SEQ ID NO: 810- Иллюстративная каркасная область 4 VL
FGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 811— Иллюстративная CDR2 VH
TISYSGSHISYHDSVHH

SEQ ID NO: 812— Иллюстративная CDR2 VH
TISYHGSLISYHDSVHH

SEQ ID NO: 813— Иллюстративная CDR2 VH

TISYHGSHISYADSVHH

SEQ ID NO: 814 — Иллюстративная CDR2 VH

TISYHGSHISYHDSVKH

SEQ ID NO: 815 — Иллюстративная CDR2 VH

TISYHGSHISYHDSVHG

SEQ ID NO: 816 — Иллюстративная CDR2 VH

TISYHGSLISYADSVKG

SEQ ID NO: 817 — Иллюстративная CDR2 VH

TISYSGSHISYADSVKG

SEQ ID NO: 818 — Иллюстративная CDR2 VH

TISYHGSHISYADSVKG

SEQ ID NO: 819 — Иллюстративная CDR3 VH

IHNDPMDV

SEQ ID NO: 820 — Иллюстративная CDR3 VH

IHNDPMDV

SEQ ID NO: 821 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSHISYHDSVHHRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 822 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YSGSHISYHDSVHHRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 823 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSLISYHDSVHHRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 824 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSHISYADSVHHRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 825 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSHISYHDSVKHRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 826 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSHISYHDSVHGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 827 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSHISYHDSVHHRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARINHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 828 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSHISYHDSVHHRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 829 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSLISYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 830 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YSGSHISYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 831 -- Иллюстративная VH

EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIS
YHGSHISYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHNDPMDVWG
QGTLVTVSS

Включение посредством ссылки

Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки в полном их объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

Хотя обсуждались конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничительным. Многие варианты настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники после рассмотрения настоящего описания и нижеприведенной формулы изобретения. Полный объем настоящего изобретения должен устанавливаться со ссылкой на пункты формулы изобретения вместе с полным объемом их эквивалентов и описанием вместе с такими вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PAR2, содержащие переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит:
 - i) VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13,
 - ii) VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 818,
 - iii) VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и при этом VL содержит:
 - i) VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18,
 - ii) VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19,
 - iii) VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 831, и где VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 17.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 12, и где VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 17.
4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где VH содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 12, и где VL содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 17.
5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv или Fab'.
6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело представляет собой IgG.
8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где VH кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 11, и/или где VL кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 16.
9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент предотвращает взаимодействие трипсина, триптазы и/или матриптазы с PAR2.
10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с PAR2 с большей аффинностью при pH 7,4, чем при pH 6,0.
11. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10.
12. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10 и содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 11.
13. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменный домен легкой цепи (VL) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10 и содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 16.
14. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.11-13.
15. Набор экспрессирующих векторов, содержащий:
 - a) нуклеиновую кислоту по п.12 и
 - b) нуклеиновую кислоту по п.13.
16. Клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов по п.14 или набор векторов по п.15.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10.
18. Фармацевтический набор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10 или композицию по п.17 и один или несколько контейнеров.

19. Способ лечения боли, проявляющейся при заболеваниях, при которых экспрессируется PAR2, у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10 или композиции по п.17.

20. Способ по п.19, где боль выбрана из группы, состоящей из ноцицептивной, нейропатической и боли смешанного типа.

21. Способ по п.19, где боль связана с головной болью, хронической головной болью, мигреновой головной болью, раком, вирусной инфекцией, ревматоидным артритом, остеоартритом, болезнью Крона, болезнью печени, рассеянным склерозом, повреждением спинного мозга, постгерпетической невралгией, диабетической нейропатией, болью в нижней части спины, воспалительным заболеванием сердца, заболеванием почки, гастритом, гингивитом, заболеванием пародонта, астмой, хронической обструктивной болезнью легких, аутоиммунным заболеванием, синдромом раздраженного кишечника, фибромиалгией, болями в ногах, синдромом беспокойных ног, диабетической нейропатией, аллергическим состоянием, хирургической процедурой, острым или хроническим физическим повреждением, переломом кости или повреждением раздавливанием, повреждением спинного мозга, воспалительным заболеванием, состоянием невоспалительной нейропатической или дисфункциональной боли или их комбинацией.

22. Способ по п.21, где боль представляет собой боль при остеоартрите.

23. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10, предусматривающий стадии экспрессии нуклеиновой кислоты по п.11 или нуклеиновых кислот по пп.12 и 13 в культивируемой клетке и очистки антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Нумерация по Kabat	Последовательность VH																								
	CDR 2										CDR 3														
	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	101	102
PaB0057	T	I	S	Y	S	G	S	L	I	S	Y	A	D	S	V	K	G	I	N	N	D	P	M	D	V
PaB670129					H			H			H					H	H		H	H					
PaB670010									H																
PaB670020																				H					
PaB670034																				H	H				
PaB670045																			H	H					
PaB670048																			H	H					H
PaB670064																									
PaB670066																									
PaB670067																									
PaB670068																									
PaB670070																									
PaB670071																									
PaB670073																									
PaB670075																									
PaB670076																									
PaB670077																									
PaB670078																									
PaB670079																									
PaB670080																									
PaB670081				H		H	H			H	H				H	H									
PaB670082			H		H							H						H							
PaB670083			H	H			H		H		H			H											
PaB670084			H				H		H		H				H										
PaB670085				H			H		H			H	H			H									
PaB670087				H			H							H	H			H							
PaB670088					H		H		H					H	H										
PaB670089				H			H		H		H				H	H									
PaB670090				H		H	H		H		H			H											
PaB670091			H				H		H	H	H	H													
PaB670092				H			H				H				H	H									
PaB670093				H	H		H		H		H														
PaB670094				H			H	H		H				H	H										
PaB670095				H			H	H		H				H	H	H									
PaB670097		H	H				H		H			H	H	H											
PaB670098			H				H		H	H				H				H							
PaB670099				H			H		H		H				H	H									
PaB670100				H			H		H		H		H	H		H									
PaB670101																			H	H	H		H		H
PaB670102																			H						H
PaB670103																									

Фиг. 1А

Нумерация по Kabat	Последовательность VH																								
	CDR 2															CDR 3									
	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	101	102
PaB0067	T	I	S	Y	S	G	S	L	I	S	Y	A	D	S	V	K	G	I	N	N	D	P	M	D	V
PaB670104																									
PaB670105																									
PaB670106																									
PaB670107																									
PaB670108																									
PaB670114										H										H					
PaB670115				H			H	H			H	H			H	H				H					
PaB670116				H						H	H				H					H					
PaB670117							H			H					H	H	H				H				
PaB670118					H			H			H				H	H	H								
PaB670119					H			H				H			H	H					H				
PaB670120					H		H	H							H	H	H				H				
PaB670121					H			H				H				H	H				H				
PaB670122									H												H	H			
PaB670123				H			H	H			H	H			H	H					H	H			
PaB670125							H			H					H	H	H				H	H			
PaB670126					H			H			H				H		H				H	H			
PaB670127					H			H				H				H	H				H	H			
PaB670128					H		H	H							H	H	H				H	H			
PaB670136					H		H	H							H	H	H				H	H			H
PaB670137					H			H				H				H	H				H	H			H
PaB670141																					H				
PaB670142																					H	H			
PaB670143					H		H	H							H	H	H								
PaB670144					H		H	H							H	H	H					H			
PaB670146																						H			
PaB670148					H		H	H							H	H	H								
PaB670149					H		H	H							H	H	H					H			
PaB670151																						H			
PaB670152																						H	H		
PaB670153					H		H	H							H	H	H								
PaB670156																									H
PaB670157																						H	H		
PaB670158					H		H	H							H	H	H								
PaB670159					H		H	H							H	H	H					H			
PaB670160																									H
PaB670161																						H	H		
PaB670162					H		H	H							H	H	H								
PaB670163					H		H	H							H	H	H					H			

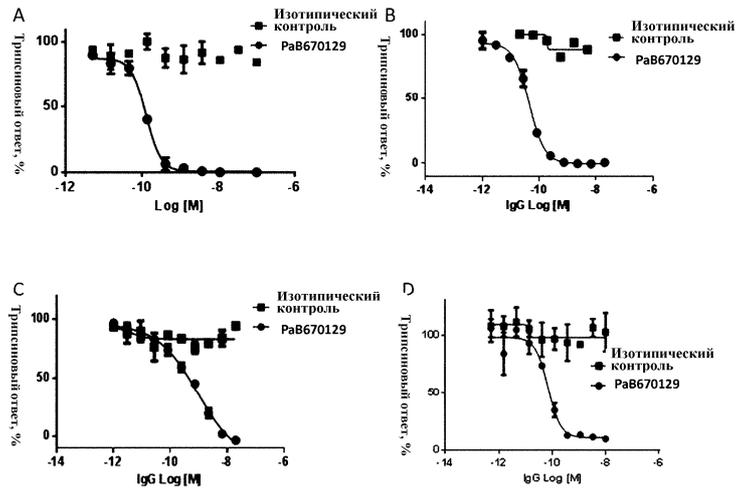
Фиг. 1В

Нумерация по Kabat	Последовательность VL													
	CDR 3													
	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	95c	95d	95e	96	97
PaB0067	Q	I	W	D	G	N	P	T	T	G	E	T	N	V
PaB670129														
PaB670010														
PaB670020														
PaB670034									H					
PaB670045														
PaB670048														
PaB670064	H			H	H			H						H
PaB670066	H	H		H			H	H						H
PaB670067	H			H	H	H		H				H		
PaB670068					H	H	H	H				H	H	
PaB670070					H		H	H			H			
PaB670071	H			H	H	H	H	H				H		H
PaB670073		H		H	H	H	H	H				H		
PaB670075		H					H	H	H					H
PaB670076	H				H	H	H					H		
PaB670077	H	H		H	H	H	H							H
PaB670078	H	H		H		H	H					H		
PaB670079		H				H	H							H
PaB670080						H	H	H						H
PaB670081														
PaB670082														
PaB670083														
PaB670084														
PaB670085														
PaB670087														
PaB670088														
PaB670089														
PaB670090														
PaB670091														
PaB670092														
PaB670093														
PaB670094														
PaB670095														
PaB670097														
PaB670098														
PaB670099														
PaB670100														
PaB670101														
PaB670102														
PaB670103	H					H	H							H

Фиг. 2А

Нумерация по Kabat	Последовательность VL															
	CDR 3															
	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	95c	95d	95e	96	97		
PaB0067	Q	T	W	D	G	N	P	T	T	G	E	T	N	V		
PaB670104		H					H	H	H							
PaB670105		H		H				H				H		H		
PaB670106	H				H			H	H	H	H			H		
PaB670107	H	H		H	H				H	H						
PaB670108		H		H		H	H	H								
PaB670114																
PaB670115																
PaB670116																
PaB670117																
PaB670118																
PaB670119																
PaB670120																
PaB670121																
PaB670122																
PaB670123																
PaB670125																
PaB670126																
PaB670127																
PaB670128																
PaB670136																
PaB670137																
PaB670141									H							
PaB670142									H							
PaB670143									H							
PaB670144									H							
PaB670146	H			H	H	H			H			H				
PaB670148	H			H	H	H			H			H				
PaB670149	H			H	H	H			H			H				
PaB670151	H				H	H	H					H				
PaB670152	H				H	H	H					H				
PaB670153	H				H	H	H					H				
PaB670156						H	H	H						H		
PaB670157						H	H	H						H		
PaB670158						H	H	H						H		
PaB670159						H	H	H						H		
PaB670160	H					H	H							H		
PaB670161	H					H	H							H		
PaB670162	H					H	H							H		
PaB670163	H					H	H							H		

Фиг. 2В

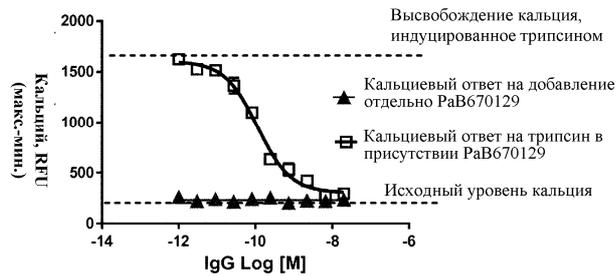


Фиг. 3

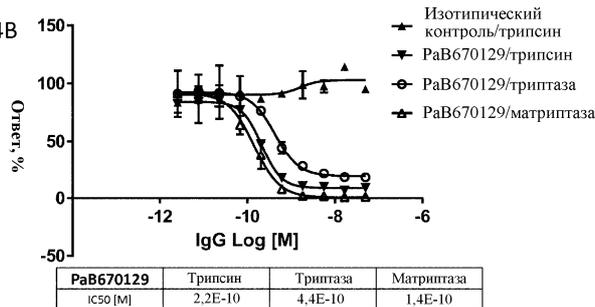
Данные по активности PAR2, полученные на FLIPR, IC ₅₀												
А549 человека FLIPR, IC ₅₀ (M)	SEM	n	KNRK крысы FLIPR, IC ₅₀ (M)	SEM	n	CYNOM макака FLIPR, IC ₅₀ (M)	SEM	n	LL/2 мыши FLIPR, IC ₅₀ (M)	SEM	n	
PaB60067	1,16E-10	1,47E-11	5	7,23E-12	1,48E-12	6	5,87E-11	1	2,58E-11	2,66E-12	2	
PaB670034	2,06E-10		1	7,92E-12		1						
PaB670045	1,42E-10		1	1,02E-11		1						
PaB670048	1,31E-10	6,15E-12	3	1,02E-11	2,41E-12	4						
PaB670061	NI		1	NI		1						
PaB670062	2,34E-09		1	7,89E-10		1						
PaB670066	7,22E-10		1	3,84E-09		1						
PaB670075	8,04E-10		1	NI		1						
PaB670076	1,15E-10	5,10E-12	2	7,89E-11	3,82E-11	2						
PaB670077	9,28E-10		1	1,56E-09		1						
PaB670078	5,88E-10		1	1,25E-09		1						
PaB670079	7,01E-10		1	4,64E-10		1						
PaB670080	2,61E-10		1	1,44E-11		1						
PaB670084	1,23E-10	3,64E-11	2	2,27E-11	7,73E-12	2						
PaB670103	2,38E-10		1	1,46E-11		1						
PaB670114	1,62E-10		1	1,35E-09		1						
PaB670115	1,28E-10		1	2,97E-10		1						
PaB670116	3,48E-10		1	2,60E-08		1						
PaB670117	1,64E-10		1	5,79E-10		1						
PaB670118	1,41E-10		1	1,04E-10		1						
PaB670119	1,08E-10		1	8,48E-11		1						
PaB670120	1,50E-10	8,95E-12	2	9,53E-11	2,02E-11	2						
PaB670121	1,13E-10		1	1,41E-10		1						
PaB670122	1,18E-10		1	NI		1						
PaB670123	2,55E-10		1	2,54E-09		1						
PaB670124	NI		1	NI		1						
PaB670125	2,27E-10		1	1,34E-09		1						
PaB670126	1,64E-10		1	3,95E-10	8,33E-11	1						
PaB670127	1,13E-10		1	2,12E-10		1						
PaB670128	1,23E-10	4,05E-12	2	2,85E-10	8,33E-11	3	3,71E-11	1				
PaB670129	1,09E-10	11,41E-11	4	5,21E-10	7,47E-11	6	4,64E-11	3,87E-12	3	5,09E-11	1,92E-11	2
PaB670130	NI		1	NI		1						
PaB670131	NI		1	NI		1						
PaB670132	NI		1	NI		1						
PaB670133	NI		1	NI		1						
PaB670134	NI		1	7,04E-10		1						
PaB670135	NI		1	4,32E-10		1						
PaB670136	1,37E-10	2,43E-11	2	4,45E-10	3,12E-11	2						
PaB670137	1,57E-10		1	1,14E-09		1						
PaB670139	9,62E-11	7,73E-12	2	3,06E-11	7,38E-12	2						
PaB670140	NI		1	NI		1						
PaB670129 F2B	3,5E-09		1	3,44E-08		1						

Фиг. 3Е

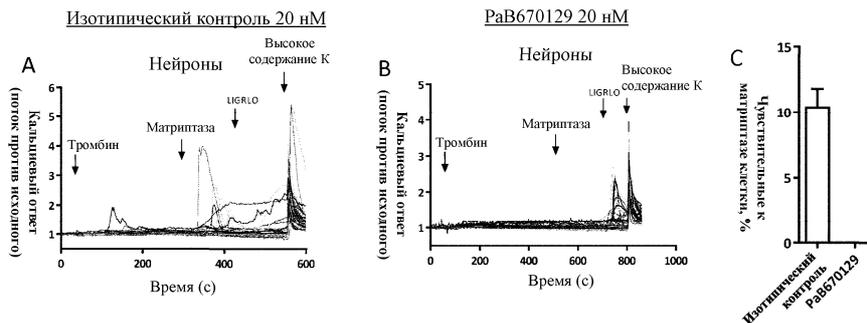
4А

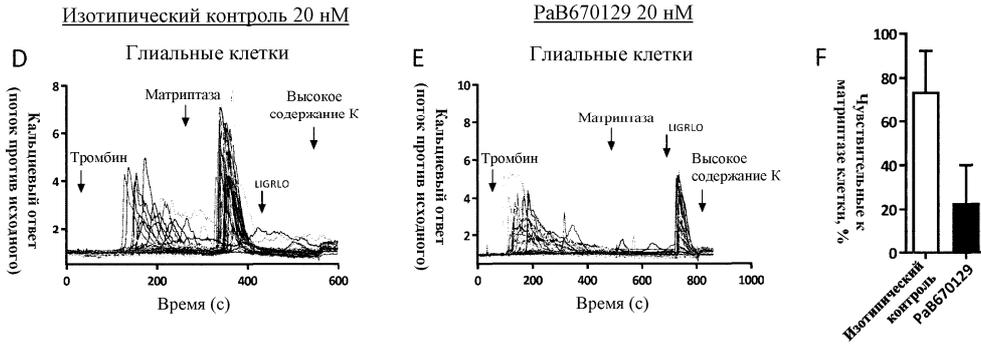


4В

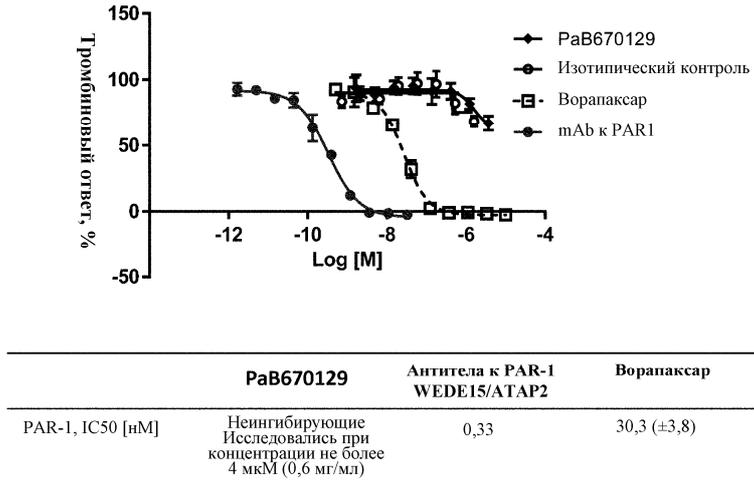


Фиг. 4

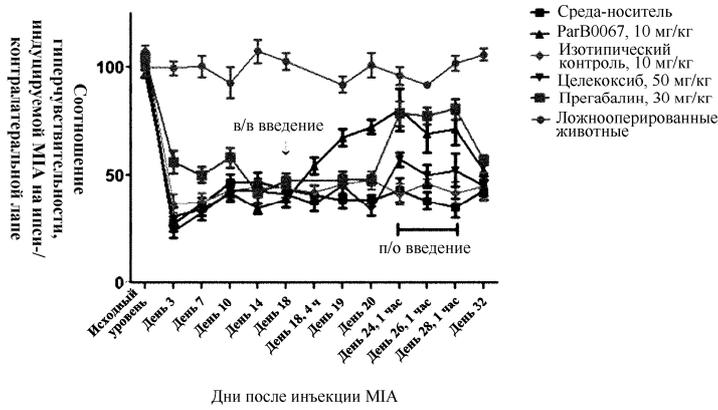




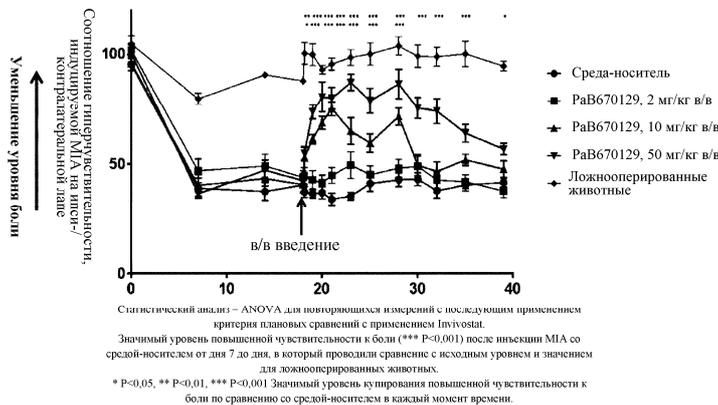
Фиг. 5



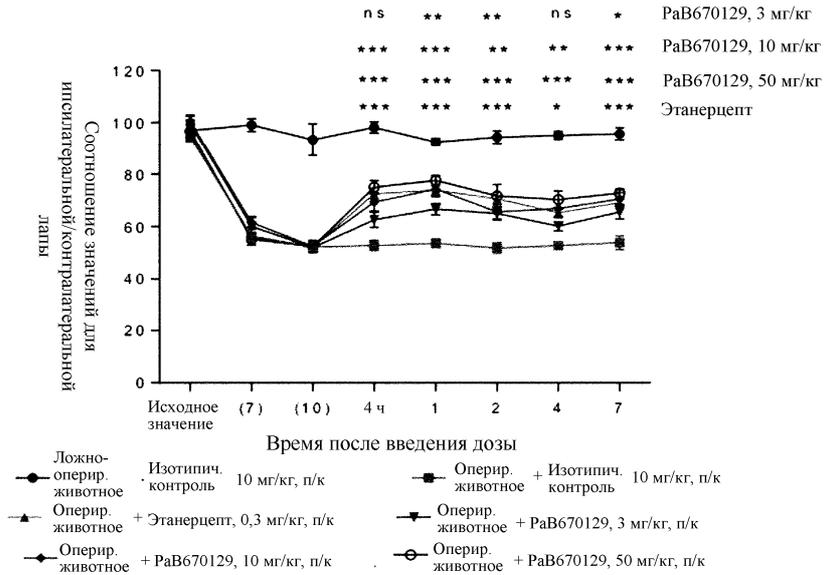
Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8

