

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391731** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.01**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)  
*A61P 17/06* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.12.14**

---

(54) **АНТИТЕЛА К CCR6**

(31) **2020904653**

(32) **2020.12.14**

(33) **AU**

(86) **PCT/AU2021/051488**

(87) **WO 2022/126180 2022.06.23**

(71) Заявитель:  
**МОНАШ ЮНИВЕРСИТИ (AU)**

(72) Изобретатель:

**Роберт Реми, Маккэй Чарльз Рей (AU)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.  
(RU)**

---

(57) Изобретение относится к CCR6, к антителам и их родственным фрагментам для связывания с указанными рецепторами, к получению указанных антител и фрагментов и к применению указанных антител и фрагментов для обнаружения и терапии различных состояний, в частности аутоиммунных заболеваний, воспаления, инфекции, онкологических заболеваний и фиброза.

**A1**

**202391731**

**202391731**

**A1**

## АНТИТЕЛА К CCR6

### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к CCR6, антителам и родственным им фрагментам для связывания с указанными рецепторами, к получению указанных антител и фрагментов и к применению указанных антител и фрагментов для определения и терапии различных состояний, в частности, воспалительных, аутоиммунных, инфекционных и онкологических.

### **Родственная заявка**

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки Австралии AU 2020904653, содержание которой включено во всей полноте путем ссылки.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Хемокины представляют собой внеклеточные сигнальные молекулы, обладающие различными функциями. Они могут инициировать и/или поддерживать различные клеточные процессы, включая хемотаксис, клеточный рост и в некоторых случаях опухолевый рост, хоуминг злокачественных клеток и метастазирование.

Хемокины также непосредственно задействованы в направленной миграции клеток иммунной системы и связаны с многочисленными аутоиммунными заболеваниями, воспалением и ответом на вирусные, бактериальные и другие инфекции. Хемокины могут действовать путем связывания, активации или ингибирования рецепторов, известных как хемокиновые рецепторы, класса сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), которые представляют собой полипептические трансмембранные белки, где белок имеет одну или более областей, пронизывающих клеточную мембрану.

Хемокиновый рецептор 6 (CCR6; CD196) экспрессируется в незрелых дендритных клетках, субпопуляциях В-клеток (зрелых, наивных и памяти) и субпопуляциях Т-клеток (мигрирующих в кожу и кишечник эффекторных Т-клеток/Т-клеток памяти и Th17-клеток). Он задействован в миграции Th17-клеток в воспаленные ткани и вовлечен в активацию и направленную миграцию лимфоцитов. Хемотаксис клеток, индуцированный связыванием рецептора CCR6 с его основным лигандом MIP-3 $\alpha$  (CCL20; СКb4; LARC; MIP-3 $\alpha$ ; MIP3A; SCYA20; ST38), играет важную роль в гомеостазе и воспалительных процессах на поверхности слизистых оболочек, в коже,

головном мозге и глазах.

В воспалении, и особенно аутоиммунных заболеваниях могут быть задействованы аутокринные и паракринные механизмы, основанные отчасти на сигнализации через ветвь CCR6-MIP-3 $\alpha$ .

Существует потребность в улучшенных реагентах для связывания с CCR6, особенно новых антителах и их фрагментах, способных связываться с CCR6 и ингибировать опосредованную MIP-3 $\alpha$  активность, для выявления и терапии различных состояний, в частности, воспаления, инфекции, онкологии и фиброза.

Ссылка в описании на какой-либо известный уровень техники не является признанием или предположением, что этот известный уровень техники является частью общеизвестных знаний в какой-либо юрисдикции, или что можно обоснованно ожидать, что специалист в области техники будет понимать указанный известный уровень техники, считать соответствующим и/или комбинировать с другими элементами уровня техники.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении предложен антигенсвязывающий белок для лечения заболевания, связанного с экспрессией CCR6. Предпочтительно, антигенсвязывающий белок ингибирует связывание MIP-3 $\alpha$  с CCR6.

В данном изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с пептидом, где пептид:

- состоит из последовательности SEQ ID NO: 2; или

- состоит из последовательности в составе последовательности SEQ ID NO: 2, указанный пептид является полезным в качестве иммуногена для создания антитела, способного связываться с CCR6.

В данном изобретении предложен пептид, где пептид:

- состоит из последовательности SEQ ID NO: 2;

- состоит из последовательности в составе последовательности SEQ ID NO: 2, указанный пептид является полезным в качестве иммуногена для создания антитела, способного связываться с CCR6.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, который способен связываться с:

- пептидом, состоящим из аминокислот с 1 до 28 CCR6, и

- пептидом, состоящим из аминокислот с 18 до 46 CCR6. Предпочтительно,

CCR6 является человеческим.

В изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, содержащий:

FR1 - CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4 и

FR1a - CDR1a – FR2a – CDR2a – FR3a – CDR3a – FR4a,

где:

каждая из FR1, FR2, FR3 и FR4 представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1, CDR2 и CDR3 представляет собой область, определяющую комплементарность;

каждая из FR1a, FR2a, FR3a и FR4a представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1a, CDR2a и CDR3a представляет собой область, определяющую комплементарность;

где последовательность любой из каркасных областей или областей, определяющих комплементарность, являются такими, как описано в данном документе.

В изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, включающий :

FR1 - CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4 и

FR1a - CDR1a – FR2a – CDR2a – FR3a – CDR3a – FR4a,

где:

каждая из FR1, FR2, FR3 и FR4 представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1, CDR2 и CDR3 представляет собой область, определяющую комплементарность;

каждая из FR1a, FR2a, FR3a и FR4a представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1a, CDR2a и CDR3a представляет собой область, определяющую комплементарность;

где последовательность любой из областей, определяющих комплементарность, имеет аминокислотную последовательность, описанную в Таблице 1 или 2 ниже. Предпочтительно, каркасные области имеют аминокислотную последовательность, также описанную в Таблицах 3 или 4 ниже, включая вариацию конкретных аминокислотных остатков, которую можно установить посредством выравнивания различных каркасных областей, происходящих из каждого антитела. Когда CDR1, CDR2 и CDR3 представляют собой последовательности переменной области тяжелой цепи антитела (VH), CDR1a, CDR2a и CDR3a представляют собой последовательности



вариабельной области легкой цепи антитела (VL) или когда CDR1, CDR2 и CDR3 представляют собой последовательности из VL, CDR1a, CDR2a и CDR3a представляют собой последовательности из VH, они также включены в изобретение.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, CDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 11, 14 102 или 103, предпочтительно, где последовательность CDR1 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, CDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 4, 7, 9, 12, 15 или 104, предпочтительно, где последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, CDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 8, 10, 13, 16, 106 или 107, предпочтительно, где последовательность CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит CDR1 вариабельной области легкой цепи, CDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 17, 20, 21, 94, 108 или 109, предпочтительно, где последовательность CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 или 94.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит CDR2 вариабельной области легкой цепи, CDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 18, 22 или 110, предпочтительно, где последовательность CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит CDR3 вариательной области легкой цепи, CDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 19, 23 или 111, предпочтительно, где последовательность CDR3 вариательной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3, где CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок содержит вариательную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3, где CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или 94, CDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6, где антигенсвязывающий белок конкурентно ингибирует связывание с CCR6 антитела:

1. содержащего VH, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88, и VL, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89;
2. содержащего VH, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96, и VL, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98;
3. содержащего VH, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 97, и VL, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98; или
4. содержащего VH, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88, и VL, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок с CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3 антитела, имеющего вариательную область тяжелой цепи, определенную в любой из SEQ ID NO: 88, 96 или 97.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок с

CDRL1, CDRL2 и/или CDRL3 антитела, имеющего вариабельную область легкой цепи, определенную в любой из SEQ ID NO: 89 или 98.

В любом воплощении в изобретении предложен антигенсвязывающий белок с CDR1, CDR2 и/или CDR3 антитела, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, определенную в любой из SEQ ID NO: 88, 96 или 97, и вариабельную область легкой цепи, определенную в любой из SEQ ID NO: 89 или 98.

В любом воплощении антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, содержит:

FR1 - CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4 – линкер - FR1a - CDR1a – FR2a – CDR2a – FR3a – CDR3a – FR4a.

Как определено в данном документе, линкер может представлять собой химическое соединение, одну или более аминокислот или дисульфидную связь, образованную между двумя остатками цистеина.

В данном изобретении предложен антигенсвязывающий белок для связывания с рецептором CCR6, содержащий:

FR1 - CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4 и

FR1a - CDR1a – FR2a – CDR2a – FR3a – CDR3a – FR4a,

где:

каждая из FR1, FR2, FR3 и FR4 представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1, CDR2 и CDR3 представляет собой область, определяющую комплементарность;

каждая из FR1a, FR2a, FR3a и FR4a представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1a, CDR2a и CDR3a представляет собой область, определяющую комплементарность;

где:

CDR1 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (G/E)(F/Y)(T/S/P)F(S/K)(D/S)(Y/F)(Y/G) (SEQ ID NO: 102), GF(S/T/P)FSDYY (SEQ ID NO: 103), GFTFSDYY (SEQ ID NO: 3), GFSFSDYY (SEQ ID NO: 6), GFPFSDYY (SEQ ID NO: 11) и EYTFKSFG (SEQ ID NO: 14);

CDR2 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: I(T/Y)(N/P)(G/R)(D/G/A/V/S)G(R/N)T (SEQ ID NO: 104), ITNG(D/G/A/V)GRT (SEQ ID NO: 105), ITNGDGRT (SEQ ID NO: 4), ITNGGGRT (SEQ ID NO: 7), ITNGAGRT (SEQ ID NO: 9), ITNGVGRT (SEQ ID NO: 12) и IYPRSGNT (SEQ ID NO: 15);

CDR3 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (T/A)(S/R)(P/S)P(L/Y)(G/D)G(A/-)(W/Y)F(G/A/D)Y (SEQ ID NO: 106), (A/T)SPPLGGAWF(G/A)Y (SEQ ID NO: 107), TSPPLGGAWFGY (SEQ ID NO: 5), ASPPLGGAWFGY (SEQ ID NO: 8), ASPPLGGAWFAY (SEQ ID NO: 10), TSPPLGGAWFAY (SEQ ID NO: 13) и ARSPYDGYFDY (SEQ ID NO: 16);

CDR1a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: QS(I/L)(V/L)H(S/I)NGNTY (SEQ ID NO: 108), QS(I/L)VHSNGNTY (SEQ ID NO: 109), QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 17), QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 20) и QSLHINGNTY (SEQ ID NO: 21);

CDR2a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (K/R)VS (SEQ ID NO: 110), RVS (SEQ ID NO: 22) и KVS (SEQ ID NO: 18); и

CDR3a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (F/S)Q(G/S)(S/T)HVP(L/R)T (SEQ ID NO: 111), FQGSHVPLT (SEQ ID NO: 19) и SQSTHVPRT (SEQ ID NO: 23);

где предпочтительно:

FR1 имеет последовательность, выбранную из групп, состоящих из: EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS (SEQ ID NO: 24), EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSCEAS (SEQ ID NO: 25), EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS (SEQ ID NO: 26), QDQLQQSGVALARPGASVKLSCKAS (SEQ ID NO: 27), EVNLVESGGGLVQPGGSLILSCEAS (SEQ ID NO: 90) и EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAS (SEQ ID NO: 80);

FR2 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: MYWVRQTPEKRLEWVTY (SEQ ID NO: 28), LYWVRQTPEKRLEWVTY (SEQ ID NO: 29), LYWVRQTPEKRLEWVAY (SEQ ID NO: 30), LGWVKQRPGQGLEWIGE (SEQ ID NO: 31) и LYWVRQAPGKGLEWVAY (SEQ ID NO: 81);

FR3 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: YYSDTVGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDAMYYC (SEQ ID NO: 32), YYSDTIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDAMYYC (SEQ ID NO: 33), YYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTSMYC (SEQ ID NO: 34), YYNEKVKGVRLTADKSSNSVYMEFRSLTSEDSAVYFC (SEQ ID NO: 35), YYSDAIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDAMYYC (SEQ ID NO: 91) и YYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRDEDTAVYYC (SEQ ID NO: 82);

FR4 имеет последовательность: WGQGTTLTVS (SEQ ID NO: 36) или WGQGTTLTVS (SEQ ID NO: 37);

FR1a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из:  
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 38),  
DVSMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 39),  
DVVMTHSPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 40) и  
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS (SEQ ID NO: 84);

FR2a имеет последовательность: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 41),  
LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 42) или LEWYLQKPGQSPRLIY (SEQ ID NO: 85);

FR3a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из:  
KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 43),  
KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 44),  
NRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO: 45) и  
KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO: 86); и

FR4a имеет последовательность: FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 46),  
FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 47) или FGQGTKLEIR (SEQ ID NO: 87).

В изобретении предложен антигенсвязывающий белок, включающий , по существу состоящий из или состоящий из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 48 - 59, 88, 89, 92, 93 и 96 - 98.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:3, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере



и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:24, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:28, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере

приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 38, и FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, и FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 46;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен



содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:6, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:7, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 49;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:25, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере



ID NO: 25, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:3, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:7, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 50;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по

меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 57;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, и

VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:24, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:29, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 38, и FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, и FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере

мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 46;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:3, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:7, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по

меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 51;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 58;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в



SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:24, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:28, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 38, и FR2,

содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, и FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 44, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 46;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по



(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:25, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:28, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на на 90%, по меньшей мере на 92%, по



содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:11, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:12, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 53;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, CDR2,

содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 55;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:





FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:80, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:81, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 82, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 83;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере

приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 87;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен

содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:14, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:15, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 16;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 54;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 23;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 59;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере



ID NO: 27, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей последовательность, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 92;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей

мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 93;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 90, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 91, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39, и FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по



меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 46;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:11, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:12, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере

приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 96 или 97;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 89;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96 или

97;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96 или 97, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:80 или 95, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:81, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 83;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по

меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 87;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80 или 95, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80 или 95, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87.

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:



мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 98;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98.

В любом аспекте изобретения антигенсвязывающий домен дополнительно содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:80, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:30, FR3,



содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87.

Как описано в данном документе, антигенсвязывающий белок может находиться в форме:

- (1) одноцепочечного Fv фрагмента (scFv);
- (2) димерного scFv (di-scFv);
- (3) одного из (1) или (2), связанного с константной областью антитела, Fc или константным доменом тяжелой цепи (CH) 2 и/или CH3; или
- (4) одного из (1) или (2), связанного с белком, связывающимся с иммунной эффекторной клеткой.

Кроме того, как описано в данном документе, антигенсвязывающий белок может находиться в форме:

- (5) диатела;
- (6) триатела;
- (7) тетратела;
- (8) Fab;
- (9) F(ab')<sub>2</sub>;
- (10) Fv;
- (11) одного из (5) - (10), связанного с константной областью антитела, Fc или константным доменом тяжелой цепи (CH) 2 и/или CH3; или
- (12) одного из (5) - (10), связанного с белком, связывающимся с иммунной эффекторной клеткой.

Вышеупомянутые антигенсвязывающие белки могут также обозначаться как антигенсвязывающие домены антител.

Предпочтительно, антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Как правило, антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, например, моноклональное антитело.

Как описано в данном документе, антигенсвязывающий белок может



представлять собой переменный домен.

В изобретении предложен антигенсвязывающий белок, включающий , по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности (в направлении от N к C концу или от C к N концу):

- SEQ ID NO: 48 и 55;
- SEQ ID NO: 49 и 56;
- SEQ ID NO: 50 и 57;
- SEQ ID NO: 51 и 58;
- SEQ ID NO: 52 и 56;
- SEQ ID NO: 53 и 55;
- SEQ ID NO: 54 и 59;
- SEQ ID NO: 88 и 89;
- SEQ ID NO: 92 и 93;
- SEQ ID NO: 96 и 98;
- SEQ ID NO: 97 и 98.
- SEQ ID NO: 88 и 98;
- SEQ ID NO: 96 и 89; или
- SEQ ID NO: 97 и 89.

В любом аспекте изобретения и в любом антигенсвязывающем белке, описанном в данном документе, дополнительно содержится Fc-область, которая сконструирована таким образом, чтобы обладать пониженной способностью индуцировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Предпочтительно, пониженная способность индуцировать ADCC обусловлена мутацией, делецией или модификацией аминокислот в Fc-области, взаимодействующих с Fc рецептором. Предпочтительно, аминокислоты, которые подвергнуты мутации, делеции или модификации, находятся в положении 234, 235 и 331 согласно последовательности SEQ ID NO:60 (где аланин представляет собой положение 118) или в положении, эквивалентном 234, 235 и 331. Предпочтительно, аминокислотные мутации представляют собой L234F, L235E и P331S. Как правило, Fc включает, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61.

В данном документе определяющие комплементарность последовательности (CDR) антигенсвязывающего белка по изобретению определяют согласно системе

нумерации IMGT.

В изобретении предложен антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, где аминокислотная последовательность, образующая один или более из FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4, представляет собой человеческую последовательность.

В изобретении предложен антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекула одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело к рецептору CCR6, содержащее антигенсвязывающий белок, имеющий последовательность, описанную в данном документе, или включающий последовательность CDR и/или FR, описанные в данном документе.

В изобретении предложено диатело или триатело, включающее антигенсвязывающий белок, имеющий последовательность, описанную в данном документе, или содержащий последовательность CDR и/или FR, описанные в данном документе.

В изобретении предложен слитый белок, содержащий антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, описанные в данном документе.

В изобретении предложен конъюгат в форме антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела или слитого белка, описанных в данном документе, конъюгированных с меткой или цитотоксическим агентом.

В изобретении предложено антитело для связывания с антигенсвязывающим белком, переменным доменом иммуноглобулина, антителом, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагментом, диателом, триателом, линейным антителом, молекулой одноцепочечного антитела или мультиспецифическим антителом, слитым белком или конъюгатом, описанными в данном документе.

В аспектах изобретения, относящихся к множеству полипептидных цепей, образующих антигенсвязывающий белок, экспрессирующая конструкция содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий, например, VH, функционально связанную с промотором, и нуклеиновую кислоту, кодирующую

полипептид, содержащий, например, VL, функционально связанную с промотором.

В другом примере экспрессирующая конструкция представляет собой бицистронную экспрессирующую конструкцию, например, содержащую следующие функционально связанные компоненты в порядке от 5' к 3':

- (1) промотор
- (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид;
- (3) внутренний сайт посадки рибосомы; и
- (4) нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид,

где первый полипептид содержит VH, а второй полипептид содержит VL, или наоборот.

Данное изобретение также предполагает отдельные экспрессирующие конструкции, одна из которых кодирует первый полипептид, содержащий VH, а другая кодирует второй полипептид содержащий VL. Например, в данном изобретении также предложена композиция, содержащая:

(i) первую экспрессирующую конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий VH, функционально связанную с промотором; и

(i) вторую экспрессирующую конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий VL, функционально связанную с промотором.

В изобретении предложена клетка, содержащая вектор или нуклеиновую кислоту, описанные в данном документе. Предпочтительно, клетка является выделенной, по существу очищенной или рекомбинантной. В одном примере клетка содержит экспрессирующую конструкцию по изобретению или:

(1) первую экспрессирующую конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий VH, функционально связанную с промотором; и

(2) вторую экспрессирующую конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий VL, функционально связанную с промотором,

где первый и второй полипептиды ассоциируются с образованием антигенсвязывающего белка по данному изобретению.

Примеры клеток по данному изобретению включают бактериальные клетки,

дрожжевые клетки, клетки насекомых или клетки млекопитающих.

В изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок или конъюгат, описанные в данном документе. Предпочтительно, нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую любую одну или более аминокислотных последовательностей, соответствующих SEQ ID NO: 3 - 62 и 80 - 98. Предпочтительно, нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, соответствующую любой одной или более из SEQ ID NO: 63-79, 99 или 100.

В изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. Предпочтительно, нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую любую одну или более аминокислотных последовательностей, соответствующих SEQ ID NO: 3 - 62 и 80 - 98. Предпочтительно, нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, соответствующую любой одной или более из SEQ ID NO: 63-79 или 99 или 100.

В изобретении предложена клетка, содержащая вектор или нуклеиновую кислоту, описанные в данном документе.

В другом воплощении предложено животное или происходящая из него ткань, содержащие клетку, описанную в данном документе.

В изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, или включающая последовательность CDR и/или FR, описанные в данном документе, или переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок или конъюгат, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

В изобретении предложена диагностическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, или включающая последовательность CDR и/или FR, описанные в данном документе, или антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок или конъюгат, описанные в данном

документе, разбавитель и, возможно, метку.

В изобретении предложен набор или изделие, содержащие антигенсвязывающий белок, или включающие последовательность CDR и/или FR, описанные в данном документе, или переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок или конъюгат, описанные в данном документе.

В изобретении предложено применение последовательности, соответствующей одному или более из CDR1, CDR2, FR1, FR2, FR3 и FR4, описанных в данном документе, для получения антигенсвязывающего белка для связывания с рецептором CCR6.

В изобретении предложено применение антигенсвязывающего белка или последовательности CDR и/или FR, описанных в данном документе, для получения антигенсвязывающего белка к рецептору CCR6, обладающего повышенной аффинностью к CCR6.

В изобретении предложена библиотека молекул нуклеиновых кислот, полученных в результате мутации антигенсвязывающего белка или последовательности CDR и/или FR, описанных в данном документе, где по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты в указанной библиотеке кодирует антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6.

В изобретении предложен способ получения антигенсвязывающего белка для связывания с рецептором CCR6, описанным в данном документе, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, в клетке или животном, как описано в данном документе.

В изобретении предложен способ для предупреждения или лечения у индивидуума состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6, включающий стадию, на которой индивидууму, нуждающемуся в лечении указанного состояния или заболевания, дают антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе. Заболевание или состояние, связанное с экспрессией CCR6, может представлять собой аутоиммунное или воспалительное

состояние, такое как псориаз, инфекцию, фиброз или злокачественное заболевание, в частности, злокачественное заболевание эпителиального происхождения, описанные в данном документе, или легочные нарушения, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма и респираторный синцитиальный вирус (РСВ).

В изобретении предложен способ задержки развития или уменьшения тяжести состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6, у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму, нуждающемуся в лечении онкологического заболевания или указанного состояния или заболевания, дают антигенсвязывающий белок, варибельный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе. Предпочтительно, заболевание представляет собой рассеянный склероз или псориаз.

В изобретении предложен способ предупреждения псориаза или артрита у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму, имеющему риск развития псориаза или артрита, дают антигенсвязывающий белок, варибельный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе. Предпочтительно, псориаз представляет собой бляшковидный псориаз.

В любом аспекте данного изобретения антигенсвязывающий белок содержит Fc-область, которая сконструирована, чтобы обладать усиленной способностью индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Предпочтительно, усиленная способность индуцировать ADCC обусловлена мутацией, делецией или модификацией аминокислот в Fc-области, взаимодействующих с Fc рецептором. Предпочтительно, аминокислоты, которые подвергнуты мутации, делеции или модификации, находятся в положении 239, 330 и/или 332 согласно последовательности SEQ ID NO: 60 (где аланин представляет собой положение 118) или в положении, эквивалентном 239, 330 и/или 332. Предпочтительно, аминокислотные мутации представляют собой S239D, A330L и I332E. Как правило, Fc содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 62.

В любом аспекте данного изобретения антигенсвязывающий белок содержит Fc-область, которая не модифицирована, чтобы обладать пониженной способностью индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Предпочтительно, аминокислоты, которые находятся в положении 234, 235 и/или 331 в последовательности SEQ ID NO: 60 (где аланин представляет собой положение 118) или в положении, эквивалентном 234, 235 и/или 331, не являются F, E и/или S, соответственно. Другими словами, аминокислота в положении 234 не является F, в положении 235 не является E и/или в положении 331 не является S.

В изобретении предложен способ предупреждения или лечения псориаза у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму, имеющему риск развития псориаза или нуждающемуся в лечении псориаза, дают антигенсвязывающий белок, ингибирующий активность CCR6, где антигенсвязывающий белок включает Fc-область, которая сконструирована, чтобы обладать пониженной способностью индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Предпочтительно, пониженная способность индуцировать ADCC обусловлена мутацией, делецией или модификацией аминокислот в Fc-области, взаимодействующих с Fc рецептором. Предпочтительно, аминокислоты, которые подвергнуты мутации, делеции или модификации, находятся в положении 234, 235 и 331 согласно последовательности SEQ ID NO:60 (где аланин представляет собой положение 118) или в положении, эквивалентном 234, 235 и 331. Предпочтительно, аминокислотные мутации представляют собой L234F, L235E и P331S. Как правило, Fc включает, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 61. Предпочтительно, псориаз представляет собой бляшковидный псориаз.

В изобретении предложен способ лечения псориаза у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму, нуждающемуся в лечении псориаза, дают антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок или конъюгат, описанные в данном документе. Предпочтительно, псориаз представляет собой бляшковидный псориаз.

В изобретении предложен способ уменьшения прогрессирования псориаза или артрита у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму, нуждающемуся в уменьшении прогрессирования псориаза, дают антигенсвязывающий

белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе. Предпочтительно, псориаз представляет собой бляшковидный псориаз.

В изобретении предложен способ стабилизации или регрессии клинических симптомов состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6, у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму, нуждающемуся в лечении указанного состояния или заболевания, дают антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе. Предпочтительно, заболевание представляет собой рассеянный склероз или псориаз.

В изобретении предложен способ лечения субъекта, у которого обнаружено наличие симптома состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6, включающий введение антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела, слитого белка, конъюгата или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, тем самым осуществляя лечение субъекта.

В изобретении предложено применение антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела, слитого белка, конъюгата или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения злокачественного заболевания или состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6.

В изобретении предложен способ диагностирования заболевания или состояния, связанного с экспрессией CCR6, включающий стадию приведения в контакт тканей или клеток, у которых следует определить наличие или отсутствие злокачественности, с реагентом в форме антигенсвязывающего белка, переменного домена



иммуноглобулина, антитела, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела, слитого белка, конъюгата или диагностической композиции, описанных в данном документе, и определение связывания реагента с тканями или клетками. Способ может осуществляться *in vivo* или *in vitro*. Способ может дополнительно включать стадию лечения субъекта, у которого обнаружено наличие заболевания или состояния. Примеры заболеваний или состояний, связанных с экспрессией CCR6, описаны в данном документе.

В любом аспекте изобретения заболевание или состояние, связанное с экспрессией CCR6, представляет собой артрит. Артрит может быть любого типа, например, любого типа, описанного в данном документе, включая остеоартрит, ревматоидный артрит и псориатический артрит.

В изобретении предложены антигенсвязывающие белки по изобретению, связывающиеся с CCR6 на живых клетках с аффинностями в диапазоне от 0,1 до 5 нМ.

Антигенсвязывающий белок, белок или антитело, описанные в данном документе, могут содержать константную область человеческого происхождения, например, константную область IgG, такую как константная область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или их смеси. В случае антитела или белка, содержащего VH и VL, VH может быть связана с константной областью тяжелой цепи, а VL может быть связана с константной областью легкой цепи.

Функциональные характеристики антигенсвязывающего белка по изобретению будут применяться с соответствующими поправками к антителу по изобретению.

Антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, может быть очищенным, по существу очищенным, выделенным и/или рекомбинантным.

Антигенсвязывающий белок по изобретению может быть частью надосадочной жидкости, взятой из среды, в которой культивировали гибридому, экспрессирующую антигенсвязывающий белок по изобретению.

В изобретении предложено однодоменное антитело, содержащее антигенсвязывающий белок для связывания с CCR6.

В данном документе, за исключением случаев, когда из контекста следует проитвоположное, термин «содержать» и его варианты, такие как «содержащий», «содержит» и «содержащийся» не предполагают исключения дополнительных вспомогательных веществ, компонентов, целых значений или стадий. Термины

«содержащий» и «включающий» используются взаимозаменяемо.

Следующие аспекты данного изобретения и следующие воплощения аспектов, описанных в предыдущих параграфах, будут очевидны из следующего описания, приведенного в качестве примера, и со ссылкой на сопровождающие графические материалы.

### **Краткое описание последовательностей**

SEQ ID NO: 1 - Аминокислотная последовательность человеческого CCR6.

SEQ ID NO: 2 - Аминокислотная последовательность с 1 по 28 из SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 - 62 и 80 - 98 - аминокислотные последовательности, описанные в Таблицах 1-7 ниже, соответствующие последовательностям CDR, FR и антигенсвязывающих доменов по изобретению.

SEQ ID NO: 63 - 79, 99 и 100 - нуклеотидные последовательности различных областей V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и Fc, показанных в Таблице 8.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Фиг. 1 и 2:** Перспективные моноклональные антитела (mAb) к CCR6 первоначально ранжировали с применением конкурентного анализа связывания лигандов и исследования хемотаксиса, как описано в данном документе.

**Фиг. 3 и 4:** отсутствие окрашивания трансфектантов hCXCR1, hCXCR2, hCXCR3 при использовании культуральной надосадочной жидкости гибридом к CCR6.

**Фиг. 5:** У mAb к CCR6, полученных при культивировании с низким содержанием сывороточного IgG и частично очищенных, сравнивали способность предупреждать связывание <sup>125</sup>I-MIP3α с трансфектантами L1.2/hCCR6. 53103 представляет собой mAb к hCCR6 от R&D.

**Фиг. 6:** У mAb к CCR6, полученных при культивировании с низким содержанием сывороточного IgG и частично очищенных, сравнивали способность предупреждать индуцированную MIP3α миграцию трансфектантов L1.2/hCCR6. 53103 представляет собой mAb к hCCR6 от R&D.

**Фиг. 7:** Очищенные mAb к CCR6 ингибировали индуцированную MIP3α миграцию трансфектантов L1.2/hCCR6.

**Фиг. 8:** Картирование эпитопов mAb к CCR6 с применением ELISA, как описано в данном документе.

**Фиг. 9:** Окрашивание человеческих РВМС с применением анти-CCR6 клонов АВ6 и АВ7. Среди свежих человеческих РВМС гейтировали популяцию лимфоцитов и

окрашивали с использованием антитела к CD3, конъюгированного с FITC, и антитела к CCR6, конъюгированного с APC (клон AB6 (a) и клон AB7 (б)).

**Фиг. 10:** Гуманизация mAb к CCR6 (AB6) посредством пересадки CDR.

**Фиг. 11:** Характеризация мышинового mAb AB6 (mAB6) и гуманизированного mAb AB6 (hAB6) при помощи проточной цитометрии. mAbs mAB6 и hAB6 распознают клетки L1.2, трансфицированные hCCR6 (зеленая линия), но не нетрансфицированные клетки L1.2 (черная линия).

**Фиг. 12:** Анализ ADCC с очищенными человеческими НК клетками: L1.2 hCCR6 в сравнении с hAB6 с модификацией Fc. Меченые клетки-мишени (hCCR6 L1.2-PK26) инкубировали с очищенными НК клетками (эффекторными клетками) и 1 мкг/мл изотипического контроля, неистощающим гуманизированным AB6 (3SFc hAB6) или гуманизированным истощающим антителом (3MFc hAB6). Гибель клеток отслеживали при помощи TO-PRO-3 иодида.

**Фиг. 13 и 14:** Создание мышей с нокином человеческого CCR6 (hCCR6+/mCCR6-/-). Окрашивание hCCR6+/mCCR6-/- спленоцитов. Спленоциты окрашивали mAb B220, конъюгированным с APC, и hAB6, конъюгированным с FITC (зеленый), анти-mCCR6 (R&D; синяя линия) или изотипическим контролем (черная линия).

**Фиг. 15:** Лечение ЭАЭ моноклональным антителом к CCR6 у мышей с нокином hCCR6+. Восьми самкам мышей hCCR6 Tg в возрасте 12 недель (5 на группу) осуществляли подкожные инъекции 100 мкг rMOG 1-117 в полном адьюванте Фрейнда. После иммунизации и 48 часов спустя мыши получали внутривенную инъекцию 200 нг коклюшного токсина. Отдельных животных осматривали ежедневно и осуществляли клиническую оценку следующим образом: 0 = отсутствие клинических проявлений заболевания, 1 = изолированная потеря тонуса хвоста, 2 = умеренный монопарез или парапарез, 3 = тяжелый парапарез, 4 = параплегия и/или тетрапарез и 5 = агония или летальный исход. На 8 день (черная стрелка) мыши получали в/в инъекцию гуманизированного неистощающего антитела к hCCR6 (hAB6) (2 мг/кг) или изотипического контрольного антитела (гуманизированное антитело к hCXCR3). \* P<,005, \*\*P<,001 – дисперсионный анализ

**Фиг. 16:** Истощение CCR6 у мышей mCCR6+/+/hCCR6+. В популяции лимфоцитов (спленоцитов) регистрировали 350000 событий. Мышам mCCR6+/+/hCCR6+ осуществляли инъекцию hAB6 3MFc (d и f); hAB6 3SFc (b и g) или

изотипического контроля (с и е). # а) представляет собой окрашивание изотипическим контрольным антителом, конъюгированным с FITC.

**Фиг. 17:** Репрезентативное окрашивание гистологических срезов спинного мозга иммунизированных животных, получавших изотипический контроль или mAb к csg6 (исследование по предупреждению). Проводили окрашивание серии срезов гематоксилином и эозином (H&E) для определения степени воспалительной клеточной инфильтрации, люксолом прочным синим (LFB: клинья) для установления целостности миелина и импрегнацию серебром по Бильшовскому для подтверждения потери и повреждения аксонов (стрелки).

**Фиг. 18:** Восьми самкам мышей hCCR6 Tg в возрасте 12 недель осуществляли подкожные инъекции 100 мкг gMOG 1-117 в полном адьюванте Фрейнда. После иммунизации и 48 часов спустя мыши получали внутривенную инъекцию 200 нг коклюшного токсина. При достижении средней клинической оценки 2 (День 15) животные получали 2 мг/кг гуманизированного антитела к hCCR6 или гуманизированного mab к hCXCR3 (изотипический контроль). Животные получали вторую инъекцию на 19 день. \* P<,005, \*\*P<,001 – дисперсионный анализ.

**Фиг. 19:** Исследование по предупреждению псориаза. IMQ-индуцированное воспаление кожи у мышей фенотипически схоже с псориазом (IMIQUIMOD-индуцированная модель псориаза (The Journal of Immunology 2009 vol. 182 no. 9 5836-5845)). В исследовании по предупреждению мыши hCCR6 Tg получали ежедневно крем IMQ или контрольный крем (вазелин) на выбритую кожу спины. (А) Представлен фенотип кожи спины мышей через 7 дней лечения. Мыши ежедневно получали изотипическое контрольное антитело (5 мг/кг) или гуманизированное mab к hCCR6, hAB6, (3Mfc или 3SFc по 5 мг/кг), начиная со дня первого нанесения крема IMQ. (В) Воздействие IMQ нарушает пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов. Мыши получали в течение 7 дней IMQ или вазелиновый крем. Окрашивание гематоксилин-эозином кожи спины мышей (контроль вазелин; IMQ + изотипический контроль или IMQ + hAB6 3Mfc). (С) IMQ индуцировал утолщение кожи спины. Антитело к hCCR6 существенно снижало утолщение кожи спины.

**Фиг. 20:** Исследование по лечению псориаза. Использовали ту же модель IMQ, как и в экспериментах, показанных на Фиг. 19, однако мыши ежедневно получали изотипическое контрольное антитело (5 мг/кг) или гуманизированное mab к hCCR6, hAB6, (3Mfc или 3SFc по 5 мг/кг), начиная с 6 дня после первого нанесения крема IMQ.

В данном исследовании по лечению измеряли утолщение кожи спины, индуцированное IMQ, оба антитела к hCCR6 существенно уменьшали утолщение кожи спины по сравнению с контролем.

**Фиг. 21:** Исследование ADCC *in vitro* Цитолитическую способность истощающих антител hAB6 (IgG1 и IgG1 с оптимизацией Fc) сравнивали с неистощающим hAB6 (Fc KO) и изотипическим контролем. Показали, что истощающие антитела hAb6 обладали существенно повышенной цитолитической способностью по сравнению с неистощающими или контрольными.

**Фиг. 22:** Исследование по лечению артрита. Верхняя панель: Трансгенные по человеческому CCR6 мыши получали инъекцию (в/б) 200 мкл сыворотки K/BXN в 0 и 1 дни. Развитие артрита оценивали, ежедневно измеряя утолщение голеностопного сустава и клинического индекса до достижения конечной точки эксперимента. Когда у мышей наблюдались симптомы артрита, и кумулятивный клинический индекс достигал 4 (на 4 день), мышей делили на 2 группы: получавших изотипическое контрольное mAb; получавших инъекцию антитела к hCCR6-FcKO (синий) и получавших инъекцию истощающего антитела к hCCR6 (зеленый) по 20 мг/кг массы тела и затем по 5 мг/кг через день в течение 1 недели. В качестве контроля мыши, которые не экспрессировали человеческий CCR6 (WT), получали внутрибрюшинную инъекцию 200 мкл сыворотки K/BXN в день 0 и 1 и истощающее антитело к hCCR6 (красный). Нижняя панель: Репрезентативные изображения голеностопных суставов мышей при достижении конечной точки эксперимента.

**Фиг. 23:** FACS-анализ связывания hAB6 (черная кривая) и мутантов hAB6 (WT/3-3; синяя кривая; 1-21/WT, зеленая кривая; 1-23/WT, красная кривая; 1-21/3-3, оранжевая кривая; 1-23/3-3, розовая кривая) с клетками hCCR6 L1.2. Фоновое значение флуоресценции вычитали в каждой экспериментальной точке и наносили на график. Рассчитывали EC50 с применением программного обеспечения GraphPad Prism.

**Фиг. 24:** (а) Трансгенным по человеческому CCR6 мышам в возрасте 6 недель давали акклиматизироваться в течение 7 дней в виварии. Разводили блеомицин (BLM) (Sigma) до 200 мкг/мл в PBS. Осуществляли инъекции блеомицина или PBS (100 мкл) мышам подкожно в один участок выбритой спины один раз в сутки в течение 28 дней. Затем мыши получали в/б инъекции mAb к человеческому CCR6 по 5 мг/кг по 3 раза в неделю, начиная с 8 дня до 27. Контрольные мыши получали в/б инъекции изотипического контроля или PBS. (б) Наблюдалось увеличение толщины кожи после

воздействия BLM и уменьшение толщины кожи при последующем лечении мышей антителом к человеческому CCR6.

**Фиг. 25:** Гистологическая оценка. Ткани кожи (а) и легкого (б) мышей, получавших PBS, изотипическое контрольное антитело и антитело к человеческому CCR6, фиксировали в формалине и погружали в парафин. Затем осуществляли окрашивание срезов гематоксилин-эозином, трихромное окрашивание по Массону и окрашивание пикросириусом красным для оценки под микроскопом.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следует понимать, что изобретение, изложенное и описанное в данном документе, охватывает все альтернативные комбинации двух или более отдельных признаков, упомянутых или очевидных, исходя из текста или графических материалов. Все эти различные комбинации составляют различные альтернативные аспекты изобретения.

Следующие аспекты данного изобретения и следующие воплощения аспектов, описанных в предыдущих параграфах, будут очевидны из следующего описания, приведенного в качестве примера, и со ссылкой на сопровождающие графические материалы.

Далее будут подробно описаны некоторые воплощения изобретения. При том, что изобретение будет описано в сочетании с воплощениями, следует понимать, что изобретение не ограничивается указанными воплощениями. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в объем данного изобретения, охарактеризованного формулой изобретения.

Авторы данного изобретения разработали антигенсвязывающие белки, например, антитела, которые связываются и ингибируют или уменьшают активность CCR6. Антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, обладают способностью ингибировать или уменьшать один или более аспектов воспаления, опухолевого роста и метастатической активности, опосредованной CCR6.

#### *Общие сведения*

В данном описании, если напрямую не указано или из контекста не следует противоположное, следует понимать, что упоминание отдельной стадии, композиции, группы стадий или группы композиций охватывает одну и множество (то есть одну или более) таких стадий, композиций, групп стадий или групп композиций. Таким образом,

в данном документе формы в единственном числе включают формы в множественном числе и наоборот, если из контекста явным образом не следует противоположное. Например, упоминание термина в единственном числе включает одно, а также два или более.

Специалисту в области техники очевидно, что возможны вариации и модификации данного изобретения, отличные от тех, которые описаны явным образом. Следует понимать, что изобретение включает все такие вариации и модификации. Изобретение также включает все стадии, признаки, композиции и соединения, упомянутые или указанные в данном описании, в отдельности или в совокупности, и всевозможные комбинации двух или более указанных стадий или признаков.

Специалисту в области техники будут очевидны многие способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данной заявке, которые могут применяться при осуществлении данного изобретения. Данное изобретение никоим образом не ограничено описанными способами и материалами.

Все патенты и публикации, упомянутые в данном документе, включены во всей полноте путем ссылки.

Конкретные примеры, описанные в данном документе, не ограничивают объем данного изобретения и предназначены лишь для иллюстрации. Функционально-эквивалентные продукты, композиции и способы очевидным образом входят в объем данного изобретения.

Любой пример или воплощение данного изобретения следует считать относящимся с соответствующими поправками к любому другому примеру или воплощению изобретения, если явным образом не указано иное.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, следует считать имеющими такое же значение, в котором их понимают специалисты в области техники (например, культуры клеток, молекулярной генетики, иммунологии, иммуногистохимии, химии белков и биохимии).

Если не указано иное, рекомбинантный белок, культура клеток и иммунологические методы, использованные в данном изобретении, являются стандартными процедурами, хорошо известными специалисту в области техники. Такие методы описаны и объяснены в литературе в таких источниках, как J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989),

T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996) и F.M. Ausubel et al. (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, включая все дополнения до настоящего времени), Ed Harlow and David Lane (editors) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), and J.E. Coligan et al. (editors) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (включая все дополнения до настоящего времени).

Описание и определения переменных областей и их частей, иммуноглобулинов, антител и их фрагментов будут более понятны на основе обсуждения в *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991, Bork et al., *J Mol. Biol.* 242, 309-320, 1994, Chothia and Lesk *J. Mol Biol.* 196:901 -917, 1987, Chothia et al. *Nature* 342, 877-883, 1989 и/или Al-Lazikani et al., *J Mol Biol* 273, 927-948, 1997.

Термин «и/или», например, «X и/или Y» следует понимать, как означающий либо «X и Y», либо «X или Y» и следует считать относящимся в явном виде к обоим значениям или к любому из значений.

В данном документе термин «происходящий из» указывает, что определенное целое число может быть получено из конкретного источника, хотя и не обязательно непосредственно из этого источника.

Упоминание в данном документе ряда, например, остатков, следует понимать, как означающий «включительно». Например, упоминание «области, содержащей аминокислоты с 56 по 65» следует понимать в значении «включительно», то есть область содержит последовательность аминокислот, с номерами 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 и 65 в определенной последовательности.

#### *Избранные определения*

CCR6 также известен как рецептор 6 хемокинов с мотивом C-X-C (CD196; BN-1, C-C CKR-6, CC-CKR-6, CCR-6, CD196, CKR-L3, CKRL3, CMKBR6, DCR2, DRY6, GPR29, GPRCY4, STRL22, рецептор 6 хемокинов с мотивом C-C). CCR6 1 представляет собой сопряженный с G белком рецептор (GPCR), который экспрессируется на многих различных клетках и тканях, включая лимфатические и нелимфатические ткани, такие как селезенка, лимфоузлы, поджелудочная железа, толстая кишка, аппендикс, тонкий кишечник. CCR6 экспрессируется на В-клетках, незрелых дендритных клетках (DC), Т-



клетках (Th1, Th2, Th17, Treg), естественных киллерных клетках (NKT клетках) и нейтрофилах.

CCR6 связывается с высокой аффинностью с CCL20, также известным как макрофагальный белок 3 альфа (MIP3 альфа). В отличие от других хемокиновых рецепторов CCR6 не связывается с другими хемокиновыми лигандами с высокой степенью специфичности.

Интерлейкин 4 (IL-4) и интерферон гамма (IFN $\gamma$ ) подавляет экспрессию CCR6 при развитии клеток Лангерганса, а интерлейкин 10 (IL-10) индуцирует его экспрессию. Провоспалительные клетки Th17 экспрессируют CCR6, а его лиганд CCL20 (MIP-3) и CCR6 влияет на миграцию провоспалительных клеток к очагам воспаления. Некоторые Th17 клетки мигрируют в очаги воспаления благодаря градиенту хемокина CCL20 (MIP-3). В некоторых моделях отсутствие CCR6 приводит к менее тяжелому аутоиммунному энцефаломиелиту.

Полагают, что CCR6 также выполняет функцию в развитии и распространении метастазов злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта. Обнаружено, что экспрессия CCR6 повышается при колоректальном раке. CCR6 также связан с болезнью Крона.

Приведенный здесь термин «CCR6» включает любые формы природного происхождения, гомологи или варианты белка рецептора 6 хемокинов с мотивом C-X-C (CCR6), которые сохраняют активность CCR6 (например, по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным белком). В некоторых воплощениях варианты или гомологи обладают идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% со всей последовательностью или частью последовательности (например, частью из 50, 100, 150 или 200 последовательных аминокислот) по сравнению с формой природного происхождения. В некоторых воплощениях белок CCR6 представляет собой белок с референсной последовательностью UniProt P15684, его гомолог или функциональный фрагмент.

В целях терминологии, но не ограничения, примером аминокислотной последовательности человеческого CCR6 является SEQ ID NO: 1.

В данном документе упоминание CCR6 относится к молекуле, которая обладает по меньшей мере одной биохимической или биофизической активностью CCR6. Биохимические или биофизические активности CCR6 включают острый

воспалительный ответ на антигенную стимуляцию сигнального пути рецептора клеточной поверхности, фагоцитарный ответ, хемотаксис, хемотаксис дендритных клеток, воспалительный ответ, морфогенез канальцев метанефроса, развитие среднего мозга, отрицательную регуляцию процесса апоптоза нейтрофилов, активацию нейтрофилов, хемотаксис нейтрофилов, сигнальный путь сопряженного с G-белком рецептора, активирующего фосфолипазу C, положительную регуляцию ангиогенеза, положительную регуляцию процесса апоптоза клеток сердечной мышцы, положительную регуляцию клеточной пролиферации, положительную регуляцию концентрации ионизированного кальция в цитозоле положительную регуляцию хемотаксиса нейтрофилов, положительную регуляцию сосудистой проницаемости, интернализацию рецепторов и передачу сигнала

Выражение «ингибирует активность CCR6» следует понимать как означающую, что антигенсвязывающий белок по данному изобретению ингибирует или уменьшает любые одну или более активностей CCR6, включая, без ограничения, связывание лиганда с CCR6; лиганд-индуцированное изменение конформации CCR6; активацию CCR6; активацию G белка; CCR6 опосредованную клеточную сигнализацию; опосредованные CCR6 миграцию клеток, воспаление, опухолевый рост, ангиогенный или метастатический ответ *in vitro* или *in vivo*; опосредованный CCR6 рост опухолевых клеток; и/или опосредованную CCR6 миграцию лейкоцитов (например, нейтрофилов, эозинофилов, тучных клеток или Т клеток). «Ингибирует опосредованную MIP-3 активность CCR6» следует понимать как то, что антигенсвязывающий белок по данному изобретению ингибирует или уменьшает одну или более активностей, описанных выше, которые опосредованы или индуцированы MIP-3. Кроме того, активность измеряют с применением подходящего анализа *in vitro*, клеточного или *in vivo*, и активность блокируется или снижается по меньшей мере на 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% или более по сравнению с активностью CCR6 в том же анализе в таких же условиях, но в отсутствие антигенсвязывающего белка. Предпочтительно, активность CCR6 опосредована или индуцирована MIP3.

SEQ ID NO: 1:

MSGESMNFSDVFDSSDYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEVRFQFSRLFVPIAYSLICV  
 FGLLGNILVVITFAFYKKARSMTDVYLLNMAIADILFVLTLPFWAVSHATGAWVFSN  
 ATCKLLKGIYAINFNCGMLLLTCISMDRYIAIVQATKSFRLRSRTLPRSKIICLVVWGL  
 SVIISSTFVFNQKYNTQGSQVCEPKYQTVSEPIRWKLLMLGLELLFGFFIPLMFMIFC

YTFIVKTLVQAQNSKRHKAIRVIIAVVLVFLACQIPHNMVLLVTAANLGKMNRSQSQS  
EKLIGYTKTVTEVLAFLHCCLNPVLYAFIQKFRNYFLKILKDLWCVRRKYKSSGFSC  
AGRYSENISRQTSETADNDNASSFTM

Термин «выделенный белок» или «выделенный полипептид» это белок или полипептид, который из-за своего происхождения или источника получения не связан с компонентами, которые связаны с ним естественным образом, сопутствующими ему в его нативном состоянии; по существу свободный от других белков из того же источника. Белок можно сделать по существу свободным от связанных естественным образом компонентов или по существу чистым путем выделения с применением методик очистки белков, известных в области техники. Под «по существу чистым» понимают, что белок по существу свободен от контаминирующих агентов, например, по меньшей мере приблизительно на 70% или 75% или 80% или 85% или 90% или 95% или 96% или 97% или 98% или 99% свободным от контаминирующих агентов.

Термин «рекомбинантный» следует понимать как означающий продукт искусственной генетической рекомбинации. Соответственно, в контексте рекомбинантного белка, содержащего антигенсвязывающий домен, этот термин не охватывает антитело естественного происхождения в организме субъекта, которое является продуктом естественной рекомбинации, происходящей при созревании В клеток. Однако, если такое антитело выделено, его следует считать выделенным белком, содержащим антигенсвязывающий домен. Аналогично, если нуклеиновая кислота, кодирующая белок, выделена и экспрессирована с применением рекомбинантных средств, образующийся белок является рекомбинантным белком, содержащим антигенсвязывающий домен антитела. Рекомбинантный белок также охватывает белок, экспрессирующийся искусственными рекомбинантными способами, когда он находится внутри клетки, ткани или субъекта, например, в котором он экспрессируется.

Термин «белок» следует считать включающим единую полипептидную цепь, то есть ряд последовательных аминокислот, соединенных пептидными связями, или ряд полипептидных цепей, ковалентно или нековалентно соединенных друг с другом (то есть комплекс полипептидов). Например, ряд полипептидных цепей может быть ковалентно связан при помощи подходящих химических или дисульфидных связей. Примеры нековалентных связей включают водородные связи, ионные связи, силы Ван-дер-Ваальса и гидрофобные взаимодействия.

Термин «полипептид» или «полипептидная цепь», как следует из предыдущего параграфа, означает ряд последовательных аминокислот, соединенных пептидными связями.

В данном документе термин «антигенсвязывающий белок» используется взаимозаменяемо с «антигенсвязывающим доменом» и следует считать означающим область антитела, способную специфически связываться с антигеном, то есть VH или VL или Fv, содержащим как VH, так и VL. Антигенсвязывающий домен не обязательно должен быть в составе целого антитела, например, он может быть изолированным (например, доменное антитело) или быть в иной форме, например, как описано в данном документе, такой как scFv.

Для задач данного изобретения термин «антитело» включает белок, способный специфически связываться с одним или несколькими близкородственными антигенами (например, CCR6) благодаря антигенсвязывающему домену, содержащемуся в составе Fv. Термин включает четырехцепочечные антитела (например, две легких цепи и две тяжелых цепи), рекомбинантные или модифицированные антитела (например, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, антитела с пересаженными CDR, приматизированные антитела, деиммунизированные антитела, сингуманизированные антитела, полуантитела, биспецифические антитела). Антитело, как правило, содержит константные домены, которые могут быть организованы в константную область или константный фрагмент или кристаллизуемый фрагмент (Fc). Примеры форм антител в качестве своей основной единицы содержат четырехцепочечную структуру. Полноразмерные антитела содержат две тяжелые цепи (~50 до 70 кДа), ковалентно связанные, и две легкие цепи (~23 кДа каждая). Легкая цепь, как правило, содержит переменную область (если таковая присутствует) и константный домен, а у млекопитающих представляет собой либо легкую цепь  $\kappa$ , либо легкую цепь  $\lambda$ . Тяжелая цепь, как правило, содержит переменную область и один или два константных домена, соединенных шарнирной областью с дополнительными константными доменами. Тяжелые цепи млекопитающих относятся к одному из следующих типов:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  или  $\mu$ . Каждая ковалентная цепь также ковалентно связана с одной из тяжелых цепей. Например, две тяжелые цепи и тяжелая и легкая цепи удерживаются вместе межцепочечными дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями. Количество межцепочечных дисульфидных связей может варьировать у различных типов антител. Каждая цепь имеет N-концевую переменную

область (VH или VL, где каждая имеет длину ~110 аминокислот) и один или более константных доменов на С-конце. Константный домен легкой цепи (CL, который имеет длину ~110 аминокислот) примыкает к первому константному домену тяжелой цепи (CH1, который имеет длину от 330 до 440 аминокислот) и связан с ним дисульфидной связью. Варибельная область легкой цепи примыкает к варибельной области тяжелой цепи. Тяжелая цепь антитела может содержать 2 или более дополнительных CH доменов (таких как CH2, CH3 и тому подобные) и может содержать шарнирную область между константными доменами CH1 и CH2. Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. В одном примере антитело представляет собой антитело грызуна (мыши или крысы) или антитело примата (такого как человек). В одном примере у тяжелой цепи антитела отсутствует С-концевой остаток лизина. В данном примере антитело является гуманизированным, сингуманизированным, химерным, с пересаженными CDR или деиммунизированным.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по существу интактной форме, в противоположность антигенсвязывающему фрагменту антитела. В частности, целое антитело включает такие, у которых тяжелая и легкая цепи включают Fc-область. Константные домены могут представлять собой константные домены с последовательностями дикого типа (например, константные домены с последовательностями дикого типа человеческого происхождения) или варианты их аминокислотных последовательностей.

В данном документе «варибельная область» относится к частям легких и/или тяжелых цепей антитела, как определено в данном документе, способным специфически связываться с антигеном, и включает аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR); то есть CDR1, CDR2 и CDR3, и каркасных областей (FR). Например, варибельная область содержит три или четыре FR (например, FR1, FR2, FR3 и, возможно, FR4) наряду с тремя CDR. VH относится к варибельной области тяжелой цепи. VL относится к варибельной области легкой цепи.

В данном документе термин «эпитоп» (синоним «антигенсвязывающая детерминанта») следует понимать как означающий область CXCR6, с которой связывается антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен

антитела. Если не указано иное, данный термин не обязательно ограничен специфическими остатками или структурой, с которой осуществляет контакт антигенсвязывающий белок. Например, данный термин включает область, охватывающую аминокислоты, приходящие в контакт с антигенсвязывающим белком и 5-10 (или более) или 2-5 или 1-3 аминокислот за пределами указанной области. В некоторых примерах эпитоп содержит ряд несмежных аминокислот, которые расположены вблизи друг друга при укладке антигенсвязывающего белка, то есть «конформационный эпитоп». Специалисту в области техники также известно, что термин «эпитоп» не ограничен пептидами или полипептидами. Например, термин «эпитоп» включает химически активные поверхностные группировки молекул, такие как углеводные боковые цепи, фосфорильные боковые цепи или сульфонильные боковые цепи, а в некоторых примерах могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда.

В данном документе термин «субъект» следует считать означаящим любых животных, включая людей, например, млекопитающих. Примеры субъектов включают человека и приматов, не являющихся человеком, без ограничения. Например, субъектом является человек.

Авторы данного изобретения разработали антитела, которые связываются и ингибируют функцию CCR6. Антитела имеют высокую аффинность к CCR6 и ингибируют опосредованный лигандом (MIP-3 $\alpha$ ) хемотаксис. Показано, что эти антитела связываются с CCR6 и естественным образом презентированы на поверхности иммунной клетки. Исходя из свойств антител, описанных в данном документе, включая Примеры, эти антитела могут найти применение для отсрочивания возникновения или уменьшения тяжести заболеваний, связанных с активностью MIP-3 $\alpha$  или экспрессией CCR6. Кроме того, показано, что эти антитела стабилизируют и вызывают регрессию наблюдаемых клинических симптомов установленного заболевания, связанного с активностью MIP-3 $\alpha$  или экспрессией CCR6.

«Антитела» или «иммуноглобулины» или «Ig» представляют собой белки, относящиеся к гамма-глобулинам, которые обнаруживаются в крови или других жидкостях тела позвоночных, которые функционируют в иммунной системе, для связывания антигена, тем самым обнаруживая и нейтрализуя чужеродные объекты.

Антитела обычно представляют собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей.

Каждая L цепь связана с H цепью посредством одной ковалентной дисульфидной связи. Две H цепи связаны друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей в зависимости от изотипа H цепи. Каждая H и L цепь также имеет расположенные с равными интервалами внутрицепочечные дисульфидные мостики.

H и L цепи определяют специфические домены Ig. Более конкретно, каждая H цепь имеет на N-конце переменный домен (VH), за которым расположены три константных домена (CH) для каждой из  $\alpha$  и  $\gamma$  цепей и четыре CH домена для изотипов  $\mu$  и  $\epsilon$ . Каждая L цепь имеет на N-конце переменный домен (V L), за которым на другом ее конце расположен константный домен (CL). VL примыкает к VH, а CL примыкает к первому константному домену тяжелой цепи (CH1).

Антитела могут быть отнесены к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющие тяжелые цепи, обозначаемые  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно. Классы  $\gamma$  и  $\alpha$  дополнительно подразделяются на подклассы на основе относительно небольших различий в последовательности и функции CH, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. L цепь любого вида позвоночного может быть отнесена к одному из двух четко различимых типов, обозначаемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Константный домен включает Fc часть, которая содержит карбокси-концевую часть обеих H цепей, удерживаемых вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител, такие как ADCC, определяются последовательностями в Fc-области, которая также является частью, распознаваемой Fc рецепторами (FcR), обнаруживаемыми на некоторых типах клеток.

Расположение VH и VL парами образует «переменную область» или «переменный домен», включающий амино-концевые домены тяжелой или легкой цепи антитела. Переменный домен тяжелой цепи может обозначаться «VH». Переменный домен легкой цепи может обозначаться «VL». Антигенсвязывающий белок содержит V домен, который влияет на связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. V R&D области охватывают приблизительно 110 аминокислотных остатков и состоят из относительно неизменных участков, обозначаемых каркасными областями (FR) (как правило, приблизительно 4) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями чрезвычайной изменчивости, обозначаемыми «гиперпеременными

областями» (как правило, приблизительно 3), каждая из которых имеет длину 9-12 аминокислот. FR главным образом принимают конфигурацию  $\beta$ -слоя, а гипервариабельные области образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях являющиеся частью структуры  $\beta$ -слоя.

«Гипервариабельная область», «HVR», или «HV» относится к областям вариабельного домена антитела, которые имеют гипервариабельную последовательность и/или образуют структурно очерченные петли. Как правило, антитела содержат шесть гипервариабельных областей; три в VH (H1, H2, H3), и три в VL (L1, L2, L3). Имеет хождение и входит в объем данного документа ряд описаний гипервариабельной области.

В данном документе термин «области, определяющие комплементарность» (син. CDR; то есть CDR1, CDR2 и CDR3) относится к аминокислотным остаткам вариабельной области антитела, наличие которых вносит основной вклад в специфическое связывание антигена. Каждый домен вариабельной области (VH или VL) обычно имеет три CDR, обозначаемые как CDR1, CDR2 и CDR3. CDR в VH также обозначаются в данном документе CDR H1, CDR H2 и CDR H3, соответственно, где CDR H1 соответствует CDR 1 в VH, CDR H2 соответствует CDR 2 в VH, а CDR H3 соответствует CDR 3 в VH. Аналогично, CDR в VL в данном документе обозначаются CDR L1, CDR L2 и CDR L3, соответственно, где CDR L1 соответствует CDR 1 в VL, CDR L2 соответствует CDR 2 в VL, а CDR L3 соответствует CDR 3 в VL. В одном примере аминокислотные положения, отнесенные к CDR и FR, определяют согласно Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 и 1991 (также обозначаемому в данном документе «система нумерации Kabat»). В другом примере аминокислотные положения, отнесенные к CDR и FR, определяют согласно схеме нумерации Enhanced Chothia Numbering Scheme (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>). Данное изобретение не ограничено FR и CDR, определяемым по системе нумерации Kabat, но включает все системы нумерации, включая каноническую систему нумерации или систему Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342: 877-883, 1989; и/или Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 273: 927-948, 1997; систему нумерации Honnegher и Plückthun *J. Mol. Biol.* 309: 657-670, 2001; или систему IMGT, которая обсуждается Giudicelli et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 206-211 1997. В одном примере CDR определяют согласно системе нумерации Kabat. Возможно, CDR2 тяжелой цепи согласно системе нумерации Kabat не содержит



пять С-концевых аминокислот, перечисленных в данном документе, или любые одна или более из этих аминокислот замещены другой аминокислотой природного происхождения. В этой связи Padlan et al., FASEB J., 9: 133-139, 1995, установил, что пять С-концевых аминокислот CDR2 тяжелой цепи обычно не вовлечены в связывание антигена.

«Каркасные» или «FR» остатки представляют собой остатки вариабельного домена, не являющиеся остатками гипервариабельной области или CDR, определенными в данном документе. FR в VH в данном документе также обозначаются FR H1, FR H2, FR H3 и FR H4, соответственно, где FR H1 соответствует FR 1 в VH, FR H2 соответствует FR 2 в VH, FR H3 соответствует FR 3 в VH, а FR H4 соответствует FR 4 в VH. Аналогично, FR в VL в данном документе обозначаются FR L1, FR L2, FR L3 и FR L4, соответственно, где FR L1 соответствует FR 1 в VL, FR L2 соответствует FR 2 в VL, FR L3 соответствует FR 3 в VL, а FR L4 соответствует FR 4 в VL.

«Пептид для образования антигенсвязывающего белка» как правило относится к пептиду, который может образовывать конформацию, которая обеспечивает специфичность антитела к антигену. Примеры включают целое антитело или родственные целому антителу структуры, фрагменты целого антитела, включающие вариабельный домен, вариабельные домены и их фрагменты, включая легкую и тяжелую цепи, или фрагменты легкой и тяжелой цепей, которые включают некоторые, но не все гипервариабельные области или константные области.

«Интактное» или «целое» антитело представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающий белок, а также CL и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой нативные последовательности константных доменов (например, нативные последовательности константных доменов человеческого происхождения) или варианты их аминокислотной последовательности.

«Родственные целому антителу структуры» включают мультимеризованные формы целого антитела.

«Фрагменты целого антитела, включающие вариабельный домен» включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv; диатела; линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Fab-фрагмент состоит из целой L цепи наряду с доменом вариабельной области

H цепи (VH), и первым константным доменом одной тяжелой цепи (CH1). Каждый Fab-фрагмент является одновалентным по отношению к связыванию антигена, то есть он имеет единственный антигенсвязывающий белок.

Fab'-фрагмент отличается от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси-конце домена CH1, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH является обозначением для Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов несут свободную тиоловую группу.

F(ab')<sub>2</sub> фрагмент приблизительно соответствует двум связанным дисульфидной связью Fab-фрагментам, обладающим двухвалентной антигенсвязывающей активностью и еще способными к образованию мостиков с антигеном.

«Fv» представляет собой фрагмент антитела, который содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий сайт. Данный фрагмент состоит из димера одного домена вариабельной области тяжелой и одного домена вариабельной области легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации.

В одноцепочечных разновидностях Fv (scFv) вариабельные домены одной тяжелой и одной легкой цепи могут быть ковалентно связаны посредством гибкого пептидного линкера, так что легкие и тяжелые цепи могут ассоциироваться в «димерную» структуру, аналогичную двухцепочечным разновидностям Fv. После укладки этих двух доменов выделяют шесть гипервариабельных петель (по 3 петли в H и L цепях), которые содействуют аминокислотным остаткам при связывании антигена и придают антителу специфичность связывания антигена.

«Одноцепочечные Fv» также сокращенно обозначаемые «sFv» или «scFv» представляют собой фрагменты антитела, содержащие VH и VL домены антитела, соединенные с образованием единой полипептидной цепи. Предпочтительно, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между VH и VL доменами, что позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена.

«Единственный вариабельный домен» представляет собой половину Fv (содержащую только три CDR, специфичных к антигену), которая обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания.

«Диатела» относятся к фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими

сайтами, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). Небольшие фрагменты антитела получают путем конструирования фрагментов sFv (см. предыдущий параграф) с короткими линкерами (приблизительно 5-10 остатков) между доменами VH и VL, так что достигается межцепочечное, но не внутрицепочечное спаривание V доменов, в результате образуется двухвалентный фрагмент, то есть фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих сайта.

Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Биспецифические антитела представляют собой гетеродимеры из двух «кроссоверных» фрагментов sFv, в которых VH и VL домены двух антител находятся на различных полипептидных цепях. Триатела и тетраатела также широко известны в области техники.

«Выделенное антитело» представляет собой антитело, которое было обнаружено и отделено и/или выделено из компонента его предсуществующего окружения. Примесные компоненты представляют собой материалы, которые будут интерферировать с терапевтическим применением антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества.

«Человеческое антитело» относится к антителу, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует таковой антитела, произведенного человеком и/или полученного с применением любых методик получения человеческих антител, изложенных в данном документе. Это определение человеческого антитела намеренно исключает гуманизованное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, не являющиеся человеческими. Человеческие антитела могут быть получены с применением различных методик, известных в области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для получения таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но эндогенные локусы которых были инактивированы.

«Гуманизованные» формы антител, не являющихся человеческими (например, грызунов) представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность, происходящую из антитела, не являющегося человеческим. В большей части гуманизованные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в котором остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области видов, не

являющихся человеческими (антитела-донора), таких как мышьиные, крысиные, кроличьи или приматов, не являющихся человеком, обладающих желаемой специфичностью, аффинностью и функциональностью антитела. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Указанные модификации производят для дальнейшего улучшения характеристик антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух, переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют таковым иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все FR являются последовательностью человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело возможно также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно человеческого иммуноглобулина.

«Моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны за исключением возможных мутаций естественного происхождения, которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одного антигенного сайта или детерминанты на антигене. В дополнение к специфичности, моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они могут быть синтезированы без примесей других антител. Моноклональные антитела могут быть получены при помощи гибридомной технологии или могут быть созданы с применением методов ДНК-рекомбинации в клетках бактерий, эукариотических животных или растений. «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из библиотек фагового дисплея.

В данном документе моноклональные антитела включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящих из конкретных биологических видов или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, при том, что оставшаяся часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящим из других

биологических видов или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они демонстрируют желаемую биологическую активность. Химерные антитела, представляющие интерес, включают в данном документе «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, происходящие из приматов, не являющихся человеком (например, обезьян Старого Света, человекообразных обезьян и так далее) и последовательностей константной области человеческого происхождения.

Термин «антитело к CCR6» или «антитело, связывающееся с CCR6» относится к антителу, которое способно связываться с CCR6 с достаточной аффинностью, так что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента, нацеленного на CCR6. Предпочтительно, степень связывания антитела к CCR6 с неродственным рецепторным белком составляет менее чем приблизительно 10% от связывания с CCR6 при определении, например, при помощи радиоиммунного анализа (RIA). В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с CCR6, имеет константу диссоциации ( $K_d$ )  $< 1$  мкМ,  $< 100$  нМ,  $< 10$  нМ,  $< 1$  нМ или  $< 0,1$  нМ.

«Аффинность связывания» как правило относится к прочности всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Как правило, «аффинность связывания» относится к характерной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антитела и антигена). Аффинность молекулы X к его партнеру Y можно обычно представлять константой диссоциации ( $K_d$ ). Аффинность можно измерять общепринятыми способами, известными в области техники, включая описанные в данном документе. Низкоаффинные антитела обычно связывают антиген медленно и склонны к легкой диссоциации, тогда как высокоаффинные антитела обычно связывают антиген быстрее и склонны дольше оставаться связанными. В области техники известно множество способов измерения аффинности, любой из которых может применяться для задач данного изобретения.

В данном документе термин «связывается» применительно к взаимодействию антигенсвязывающего белка или его антигенсвязывающего домена с антигеном означает, что взаимодействие зависит от присутствия на антигене конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа). Например, антитело распознает и связывается с конкретной белковой структурой, нежели с белками в

целом. Если антитело связывается с эпитопом «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп «А» (или свободного немеченного «А») в реакции, содержащей меченный «А» и белок, будет уменьшать количество меченного «А», связанного с антителом.

В данном документе термин «специфически связывается» или «связывается специфически» следует считать означающим, что антигенсвязывающий белок по изобретению ступает в реакцию или ассоциируется более часто, более быстро, с большей продолжительностью и/или большей аффинностью с конкретным антигеном или экспрессирующей его клеткой, чем с альтернативными антигенами или клетками. Например, антигенсвязывающий белок связывается с CCR6 (например, hCCR6) с существенно большей аффинностью (например, в 1,5 раза или 2 раза или 5 раз или 10 раз или 20 раз или 40 раз или 60 раз или 80 раз или 100 раз или 150 раз или 200 раз), чем с другими CCR. В примере данного изобретения антигенсвязывающий белок, который «специфически связывается» с CCR6 (предпочтительно, человеческим) с аффинностью по меньшей мере, в 1,5 раза или 2 раза или выше (например, в 5 раз или 10 раз или 20 раз или 50 раз или 100 раз или 200 раз), чем с другим хемокиновым рецептором, таким как CXCR1, CXCR2, CXCR3 или CXCR7. Как правило, но не обязательно, упоминание связывания означает специфическое связывание, и каждый термин следует понимать относящимся явным образом к другому термину.

В данном документе термин «не связывается детектируемо» следует понимать, как означающий, что антигенсвязывающий белок, например, антитело связывается с антигеном-кандидатом на уровне, превышающем фоновый менее чем на 10% или 8% или 6% или 5%. Фоновый уровень может представлять собой уровень сигнала связывания, определяемый в отсутствие белка и/или в присутствии отрицательного контрольного белка (например, изотипического контрольного антитела) и/или уровень связывания, определяемый в присутствии отрицательного контрольного антигена. Уровень связывания определяют при помощи анализа с применением биосенсора (например, Biosage), в котором антигенсвязывающий белок иммобилизуют и приводят в контакт с антигеном.

В данном документе термин «не связывается существенным образом» следует понимать как то, что уровень связывания антигенсвязывающего белка по изобретению с полипептидом не превышает фоновый статистически значимо, например, уровень сигнала связывания, определяемый в отсутствие антигенсвязывающего белка и/или в присутствии отрицательного контрольного белка (например, изотипического

контрольного антитела) и/или уровень связывания, определяемый в присутствии отрицательного контрольного полипептида. Уровень связывания определяют при помощи анализа с применением биосенсора (например, *Viacore*), в котором антигенсвязывающий белок иммобилизуют и приводят в контакт с антигеном.

Антитело «созревшей аффинности» представляет собой антитело с одним или более изменениями в одном или более его HVR, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигену по сравнению с родительским антителом, которое не имеет указанных изменений. Предпочтительные антитела созревшей аффинности будут обладать аффинностью к антигену-мишени в наномолярном и даже пикомолярном диапазоне. Антитела созревшей аффинности получают способами, известными в области техники.

«ADCC» относится к процессу под названием антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, представляющему собой иммунный ответ, опосредуемый у человека преимущественно естественными киллерными (NK) клетками. В ADCC FcγRIII на поверхности NK клетки распознает Fc область антитела, которая связана с антигеном, экспонированным на поверхности клетки-мишени. Это приводит к активации NK клетки, которая высвобождает перфорины и гранзимы, приводя к лизису и апоптозу клеток-мишеней.

«CDC» относится к сложному процессу под названием комплемент-зависимая цитотоксичность, которая может приводить к уничтожению клеток под действием каскада белков, которые действуют через любой из двух основных путей.

«ADCP» относится к процессу под названием антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз. В этом процессе, опосредуемом Fc рецептором, клетки-мишени, с которыми связаны антитела, захватываются фагоцитирующими клетками, такими как макрофаги, моноциты, нейтрофилы и дендритные клетки. В данном процессе задействовано множество Fc рецепторов.

«Блокирующее» антитело или «антагонистическое» антитело представляет собой антитело, которое ингибирует или уменьшает биологическую активность антигена, с которым оно связывается. Предпочтительные блокирующие антитела или антагонистические антитела существенно или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

«Агонистическое антитело» в данном документе представляет собой антитело, имитирующее по меньшей мере одну из функциональных активностей полипептида,

представляющего интерес.

В данном документе «Fc-область» представляет собой димер из двух полипептидных цепей, соединенных одной или более дисульфидными связями, каждая цепь содержит весь шарнирный домен или его часть плюс CH<sub>2</sub> и CH<sub>3</sub> домен. Каждая полипептидная цепь обозначается «полипептидная цепь Fc». Для различения двух полипептидных цепей Fe одна обозначается в данном документе как «А цепь», а другая как «В цепь». Более конкретно, Fc-области, предполагаемые для применения в данном изобретении, представляют собой Fc-области IgG, которые могут представлять собой Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 млекопитающего или человека. Среди Fc-областей IgG1 человека известно по меньшей мере два аллельных типа.

Под «Fc-содержащим белком» в данном документе понимают белок, содержащий Fc-область, описанную в данном документе, и связывающую область, которая связывается с молекулой-мишенью. Термин «Fc-содержащий белок» охватывает антитело или слитый с Fc белок, который содержит Fc-область.

«Заболевание или состояние, связанное с экспрессией CCR6» включает, без ограничения, воспалительное состояние, описанное в данном документе, аутоиммунное заболевание, описанное в данном документе, инфекцию, фиброз или онкологическое заболевание, в частности, злокачественное заболевание эпителиального происхождения, описанное в данном документе, или легочные нарушения, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма и респираторный синцитиальный вирус (РСВ). Другие заболевания или состояния описаны в данном документе далее.

Выражение «терапевтически эффективное количество» как правило относится к количеству антигенсвязывающего белка по данному изобретению, которое (1) лечит конкретное заболевание, состояние или нарушение, (2) ослабляет, улучшает или устраняет один или более симптомов конкретного заболевания, состояния или нарушения или (3) задерживает возникновение одного или более симптомов конкретного заболевания, состояния или нарушения, описанных в данном документе.

Слова «лечить» или «лечение» относятся к терапевтическому воздействию, где задачей является замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения. Для задач данного изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают, без ограничения, смягчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (то есть отсутствие ухудшения)



течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как детектируемые так и недетектируемые. Лечение также может означать пролонгирование выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения. Лечение может не обязательно приводить к полной регрессии заболевания или нарушения, но может сокращать или минимизировать осложнения и побочные эффекты инфекции и прогрессирование заболевания или нарушения. Успех или неуспех лечения можно отслеживать, помимо прочего, посредством медицинского осмотра индивидуума, цитопатологическими, серологическими методами определения, методами определения ДНК или мРНК.

Можно осуществлять наблюдение или оценивать лечение псориаза по уменьшению тяжести или обратному развитию любого одного или более клинически или биохимически наблюдаемых или измеряемых характеристик псориаза, включая бляшки, гиперпролиферацию кератиноцитов, нарушение дифференцировки клеток эпидермиса (паракератоз), которое обычно проявляется задержкой ядер в роговом слое, отсутствием зернистого слоя, измененным паттерном экспрессии инволюкрина, утолщением эпидермиса, эритемой, шелушением или любыми другими признаками, описанными в данном документе.

Слова «предотвращать» и «предупреждение», как правило, относятся к профилактическим или превентивным мерам для защиты или не допущения развития указанного заболевания или нарушения у индивидуума, не имеющего заданного заболевания или нарушения.

Индивидуум, имеющий риск развития псориаза, может быть выявлен практикующим медиком на основании известных биохимических и клинических индикаторов предрасположенности.

Выражение «фармацевтически приемлемый» указывает, что вещество или композиция должны быть совместимы химически и/или токсикологически с другими ингредиентами, образующими состав, и/или млекопитающим, получающим лечение ими.

Авторы изобретения установили последовательности CDR переменных доменов ряда клонов, у которых они обнаружили связывание с CCR6. Эти последовательности CDR показаны в Таблице 1 ниже.

В одном воплощении предложен пептид, имеющий последовательность,

показанную в Таблицах 1 и 2. Эти пептиды могут оказаться особенно полезными в конструировании антигенсвязывающих белков, переменных доменов, антител и родственных им фрагментов.

Таблица 1: Последовательности CDR V<sub>H</sub>

<u>Клон</u>	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
AB1	SEQ ID NO: 3 GFTFSDYY	SEQ ID NO: 4 ITNGDGRT	SEQ ID NO: 5 TSPPLGGAWFGY
AB2	SEQ ID NO: 6 GFSFSDYY	SEQ ID NO: 7 ITNGGGRT	SEQ ID NO: 5 TSPPLGGAWFGY
AB3	SEQ ID NO: 3 GFTFSDYY	SEQ ID NO: 7 ITNGGGRT	SEQ ID NO: 8 ASPPLGGAWFGY
AB4	SEQ ID NO: 3 GFTFSDYY	SEQ ID NO: 7 ITNGGGRT	SEQ ID NO: 8 ASPPLGGAWFGY
AB5	SEQ ID NO: 3 GFTFSDYY	SEQ ID NO: 9 ITNGAGRT	SEQ ID NO: 10 ASPPLGGAWFAY
AB6	SEQ ID NO: 11 GFPFSDYY	SEQ ID NO: 12 ITNGVGRT	SEQ ID NO: 13 TSPPLGGAWFAY
AB7	SEQ ID NO: 14 EYTFKSFG	SEQ ID NO: 15 IYPRSGNT	SEQ ID NO: 16 ARSPYDGYFDY
AB11	SEQ NO: 6 GFSFSDYY	SEQ ID NO: 7 ITNGGGRT	SEQ ID NO: 5 TSPPLGGAWFGY
1-21 & 1-23	SEQ ID NO: 11 GFPFSDYY	SEQ ID NO: 12 ITNGVGRT	SEQ ID NO: 5 TSPPLGGAWFGY

Таблица 2: Последовательности CDR V<sub>L</sub>

<u>Клон</u>	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
AB1	SEQ ID NO: 17 QSIVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT

AB2	SEQ ID NO: 20 QSLVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT
AB3	SEQ ID NO: 17 QSIVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT
AB4	SEQ ID NO: 20 QSLVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT
AB5	SEQ ID NO: 20 QSLVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT
AB6	SEQ ID NO: 17 QSIVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT
AB7	SEQ ID NO: 21 QSLHINGNTY	SEQ ID NO: 22 RVS	SEQ ID NO: 23 SQSTHVPR
AB11	SEQ ID NO: 20 QSLVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT
3-3	SEQ ID NO: 94 RSIVHSNGNTY	SEQ ID NO: 18 KVS	SEQ ID NO: 19 FQGSHVPLT

Авторы изобретения установили последовательности FR переменных доменов ряда клонов, у которых они обнаружили связывание с CCR6. Эти последовательности FR показаны в Таблицах 3 и 4 ниже. Другие известные последовательности FR могут найти применение с описанными выше CDR с образованием антигенсвязывающего белка для связывания с CCR6.

Таблица 3: Каркасные области V<sub>H</sub>

<u>Клон</u>	<u>FR1</u>
AB1, AB3, AB4	SEQ ID NO: 24 EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS
AB2, AB5	SEQ ID NO: 25 EVNLVESGGGLVQPGGSLKSCEAS
AB6	SEQ ID NO: 26

	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
AB7	SEQ ID NO: 27 QDQLQQSGVALARPGASVKLSCKAS
hAB6, 1-21	SEQ ID NO: 80 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
AB11	SEQ ID NO: 90 EVNLVESGGGLVQPGGSLILSCEAS
1-23	SEQ ID NO: 95 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS
<u>Клон</u>	<u>FR2</u>
AB1, AB2, AB4, AB5, AB11	SEQ ID NO: 28 MYWVRQTPEKRLEWVTY
AB3	SEQ ID NO: 29 LYWVRQTPEKRLEWVTY
AB6	SEQ ID NO: 30 LYWVRQTPEKRLEWVAY
AB7	SEQ ID NO: 31 LGWVKQRPGQGLEWIGE
hAB6, 1-21, 1-23	SEQ ID NO: 81 LYWVRQAPGKGLEWVAY
<u>Клон</u>	<u>FR3</u>
AB1, AB3, AB4, AB5	SEQ ID NO: 32 YYSDTVGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYCYC
AB2	SEQ ID NO: 33 YYSDTIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAMYCYC
AB6, 1-21, 1-23	SEQ ID NO: 34 YYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTSMYYC
AB7	SEQ ID NO: 35

	YYNEKVKGKVRLTADKSSNSVYMEFRSLTSEDSAVYFC
hAB6	SEQ ID NO: 82 YYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRDEDTAVYYC
AB11	SEQ ID NO: 91 YYSDAIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAMYCC
<u>Клон</u>	<u>FR4</u>
AB1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6, AB11	SEQ ID NO: 36 WGQGTLVTVS
AB7	SEQ ID NO: 37 WGQGTTLTVS
hAB6, 1-21, 1-23	SEQ ID NO: 83 WGQGTLVTVS

Таблица 4: Каркасные области VL

<u>Клон</u>	<u>FR1</u>
AB1, AB6, AB3, AB4	SEQ ID NO: 38 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS
AB2, AB5, AB11	SEQ ID NO: 39 DVSMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS
AB7	SEQ ID NO: 40 DVVMTHSPLSLPVSLGDQASISCRSS
hAB6, 3-3	SEQ ID NO: 84 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS
<u>Клон</u>	<u>FR2</u>
AB1, AB3, AB4, AB5, AB2, AB6, AB11	SEQ ID NO: 41 LEWYLQKPGQSPKLLIY
AB7	SEQ ID NO: 42 LHWYLQKPGQSPKLLIY

hAB6, 3-3	SEQ ID NO: 85 LEWYLQKPGQSPRLLIY
<u>Клон</u>	<u>FR3</u>
AB1, AB3, AB6, AB5, AB2, AB11	SEQ ID NO: 43 KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
AB4	SEQ ID NO: 44 KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
AB7	SEQ ID NO: 45 NRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC
hAB6, 3-3	SEQ ID NO: 86 KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
<u>Клон</u>	<u>FR4</u>
AB1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6, AB11	SEQ ID NO: 46 FGAGTKLELKR
AB7	SEQ ID NO: 47 FGGGTKLEIKR
hAB6, 3-3	SEQ ID NO: 87 FGQGTKLEIKR

В некоторых воплощениях предложен антигенсвязывающий белок, имеющий последовательность, показанную в Таблице 5 или 6 ниже:

Таблица 5: Домен V<sub>H</sub>

<u>Клон</u>	<u>Последовательность антигенсвязывающего белка</u>
AB1	SEQ ID NO: 48 EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWV TYITNGDGRTYYSDTVGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYYCT SPPLGGAWFGYWGQGLVTVS
AB2	SEQ ID NO: 49 EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSCEASGFSFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVT

	YITNGGGRTYYSDTIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDAMYYCTSP PLGGAWFGYWGQGTLVTVS
AB3	SEQ ID NO: 50 EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSYLYWVRQTPEKRLEWVT YITNGGGRTYYSDTVRGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDAMYYCAS PPLGGAWFGYWGQGTLVTVS
AB4	SEQ ID NO: 51 EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSYMYWVRQTPEKRLEWV TYITNGGGRTYYSDTVRGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDAMYYCA SPPLGGAWFGYWGQGTLVTVS
AB5	SEQ ID NO: 52 EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSCEASGFTFSYMYWVRQTPEKRLEWVT YITNGAGRTYYSDTVRGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDAMYYCAS PPLGGAWFAYWGQGTLVTVS
AB6	SEQ ID NO: 53 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFPSYLYWVRQTPEKRLEWVA YITNGVGRTYYSVSKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTSMYCTSP PLGGAWFAYWGQGTLVTVS
AB7	SEQ ID NO: 54 QDQLQQSGVALARPGASVKLSCKASEYTFKSFGLGWVKQRPGQGLEWIG EIYPRSGNTYYNEKVKGKVRILTADKSSNSVYMEFRSLTSEDSAVYFCARS PYDGYFDYWGQGTTLTVS
hAB6	SEQ ID NO: 88 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS AASGFPFSYLYWVRQAPGKGLEWV AYITNGVGRTYYSVSKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRDEDTA VYYCT SPPLGGAWFAYWGQGTLVTVS
AB11	SEQ ID NO: 92 EVNLVESGGGLVQPGGSLILSCEASGFSYMYWVRQTPEKRLEWVT YITNGGGRTYYSDAIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDAMYYCTSP PLGGAWFGYWGQGTLVTVS

1-21	SEQ ID NO: 96 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSDYYLYWVRQAPGKGLEWV AYITNGVGRITYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCT SPPLGGAWFGYWGQGTLVTVS
1-23	SEQ ID NO: 97 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFPFSDYYLYWVRQAPGKGLEWV AYITNGVGRITYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCT SPPLGGAWFGYWGQGTLVTVS

Таблица 6: Домен V<sub>L</sub>

<u>Клон</u>	<u>Последовательность антигенсвязывающего белка</u>
AB1	SEQ ID NO: 55 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPL TFGAGTKLELKR
AB2	SEQ ID NO: 56 DVSMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPL TFGAGTKLELKR
AB3	SEQ ID NO: 57 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPL TFGAGTKLELKR
AB4	SEQ ID NO: 58 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPL TFGAGTKLELKR
AB5	SEQ ID NO: 56 DVSMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK



	LLIYKVKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPL TFGAGTKLELKR
AB6	SEQ ID NO:55 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPL TFGAGTKLELKR
AB7	SEQ ID NO:59 DVVMTHSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLHINGNTYLHWYLQKPGQSPK LLIYRVSNRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPR TFGGGTKLEIKR
hAB6	SEQ ID NO: 89 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLL IYKVKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTF GQGTKLEIKR
AB11	SEQ ID NO: 93 DVSMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPL TFGAGTKLELKR
3-3	SEQ ID NO: 98 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSRSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLL IYKVKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTF GQGTKLEIKR

Таблица 7: Fc-области hIgG1, 3SFc и 3MFc

<u>Клон</u>	<u>Fc</u> (CH1 выделен жирным шрифтом, шарнирная область курсивом, CH2 подчеркнут, CH3 не выделен шрифтом)
hIgG1	SEQ ID NO:60 <b>A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P</b> <b>V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P</b>

	<p><b>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</b>  <b><u>CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u></b>  <b><u>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u></b>  <b><u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT</u></b>  <b><u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF</u></b>  <b>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK</b>  <b>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</b>  <b>GK</b></p>
3SFc	<p>SEQ ID NO:61</p> <p><b>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</b>  <b>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP</b>  <b>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</b>  <b><u>CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u></b>  <b><u>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u></b>  <b><u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKT</u></b>  <b><u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF</u></b>  <b>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK</b>  <b>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</b>  <b>GK</b></p>
3MFc	<p>SEQ ID NO: 62</p> <p><b>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</b>  <b>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP</b>  <b>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</b>  <b><u>CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u></b>  <b><u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u></b>  <b><u>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEE</u></b>  <b><u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u></b>  <b>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY</b>  <b>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</b>  <b>SPGK</b></p>

Таблица 8: Нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая одну или более

## аминокислотных последовательностей по изобретению

Описание	Нуклеотидная последовательность
АВ6      VH домен	SEQ ID NO: 63 GAAGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTG GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCTTTT AGTGACTATTACCTGTATTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGA GGCTGGAGTGGGTTCGCATACATCACTAATGGTGTTGGTAGGAC СТАТТАТТCAGACTCTGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG АСААТGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGAA GTCTGAGGACACATCCATGTATTACTGTACTAGTCCCCCACTGG GGGGGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC TGTCTCT
АВ1      VH домен	SEQ ID NO: 64 GAAGTGAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTG GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC AGTGACTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGA GGCTGGAGTGGGTTCACATATAТТАCTAATGGTGATGGTAGGAC СТАТТАТТCAGACACTGTAAGGGGCCGATTCACCATATCCAGA GACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGA AGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGTCCCTCCACT GGGAGGGGCCTGGTTTGTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCT
АВ2      VH домен	SEQ ID NO: 65 GAAGTGAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTG GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGAAGCCTCTGGATTCAGTTTC AGTGACTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGC GGCTGGAGTGGGTTCACATATAТТАCTAATGGTGTTGGTAGAAC СТАТТАТТCAGACACTATAAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAATGCCAGGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGA AGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGTCCCCCACT GGGGGGGGCCTGGTTTGTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC

		ACTGTTTCT
AB3 домен	VH	SEQ ID NO: 66 GAAGTGAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTG GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC AGTGACTATTATTTATATTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGA GGCTGGAGTGGGTACATATATTAATAATGGTGGTGGTAGGAC CTATTATTCAGACACTGTAAGGGGCCGATTCACCATATCCAGA GACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGA AGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGTCCTCCACT GGGAGGGGCCTGGTTTGGTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCT
AB4 домен	VH	SEQ ID NO: 67 GAAGTGAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTG GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC AGTGACTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGA GGCTGGAGTGGGTACATATATTAATAATGGTGGTGGTAGGAC CTATTATTCAGACACTGTAAGGGGCCGATTCACCATATCCAGA GACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTACAAATGAGCCGTCTGA AGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGTCCTCCACT GGGAGGGGCCTGGTTTGGTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCT
AB5 домен	VH	SEQ ID NO: 68 GAAGTGAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTG GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGAAGCCTCTGGATTCACTTTC AGTGACTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGA GGCTGGAGTGGGTACATATATTAATAATGGTGCTGGTAGAAC CTATTACTCAGACACTGTAAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGA AGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGTCCCCACT GGGAGGGGCCTGGTTTGGTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCT

<p>AB7 домен</p>	<p>VH</p>	<p>SEQ ID NO: 69</p> <p>CAGGATCAGTTACAGCAGTCTGGAGTTGCGCTGGCGAGGCCTG GGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGAATACACCTTC AAAAGCTTTGGTTTAGGCTGGGTGAAGCAGAGACCTGGTCAGG GCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTATCCTAGAAGTGGTAATAC TТАCTACAATGAGAAGGTCAAGGGCAAGGTCAGACTGACTGCA GACAAATCCTCCAACTCAGTTTACATGGAGTTCCGCAGCCTGA CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCACGATCCCCCTAT GATGGTТАCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAG TCTCC</p>
<p>AB1 домен</p>	<p>VL</p>	<p>SEQ ID NO: 70</p> <p>GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTG TACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAA ACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAA CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTСAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTСACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAG ATCTGGGAGTTTATTACTGTTTTCAAGGTTСACATGTTCCGCTC ACGTTСGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG</p>
<p>AB3 домен</p>	<p>VL</p>	<p>SEQ ID NO: 71</p> <p>GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTG TACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAA ACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAA CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTСAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTСACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATCTGGGAGTTTATTACTGTTTTCAAGGTTСACATGTTCCGCTC ACGTTСGGTGCTGGGACCAAACTGGAGCTGAAACGG</p>
<p>AB2 домен</p>	<p>VL</p>	<p>SEQ ID NO: 72</p> <p>GATGTTTCGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTG</p>

		TACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAA ACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAAG CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATCTGGGAGTTTATTACTGTTTTCAAGGTTTCACATGTTCCGCTC ACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
AB6 домен	VL	SEQ ID NO: 73 GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTG TACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAA ACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAA CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAG ATCTGGGAGTTTATTACTGTTTTCAAGGTTTCACATGTTCCGCTC ACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
AB4 домен	VL	SEQ ID NO: 74 GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTCTTG TACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAA ACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAA CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGGGGCTGAGG ATCTGGGAGTTTATTACTGTTTTCAAGGTTTCACATGTTCCGCTC ACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
AB5 домен	VL	SEQ ID NO: 75 GATGTTTCGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTG TACATAGCAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAA ACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAA CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGTTTCAG GGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATCTGGGAGTTTATTACTGTTTTCAAGGTTTCACATGTTCCGCTC

		ACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
AB7 домен	VL	<p>SEQ ID NO: 76</p> <p>GATGTTGTGATGACCCATTCTCCACTCTCCCTACCTGTCAGTCT  TGGAGATCAGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTC  TGCACATTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAA  GCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAGAGTTTCCAAC  CGATTATCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG  GGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG  ATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCCTCGG  ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG</p>
hIgG1		<p>SEQ ID NO: 77</p> <p>GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC  CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC  AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAG  GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACA  GTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT  CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA  CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA  ATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCT  GAATTCGAGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC  CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG  CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC  AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA  AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC  AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCAGCAT  CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC  ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG  AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA  GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA  ACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC  CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG</p>

	<p>CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGTC TCTCCCTGTC  TCCGGGTAAA</p>
3SFc	<p>SEQ ID NO: 78</p> <p>GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC  CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC  AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG  GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACA  GTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCT  CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA  CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA  ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT  GAACTCCTGGGGGGACCGGATGTCTTCTTCTTCCCCCAAAC  CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG  CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC  AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA  AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC  AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCATTGCCCGA  GGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC  ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG  AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA  GCGACATCGCCGTGGAGTGGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG  AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCT  CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGTGG  CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGTCTCTCCCTGTCTCCGGG  TAAA</p>
3MFc	<p>SEQ ID NO: 79</p> <p>GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC  CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC  AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG</p>



		<p>GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA  GTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT  CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA  CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA  ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT  GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC  CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC  GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA  ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA  GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA  GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC  GAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA  CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA  ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG  CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA  CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCC  TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT  GCACAACCACTACACGCAGAAGAGTCTCTCCCTGTCTCCGGGT  AAA</p>
hAB6 домен	VH	<p>SEQ ID NO: 99</p> <p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTG  GCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCTCCGGCTTCCCCTTC  TCCGACTACTACCTGTACTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCAAGG  GCCTGGAATGGGTGGCCTACATACCAACGGCGTGGGCCGGAC  CTACTACTCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGG  GACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGC  GGGACGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCACCTCCCCACCCCT  GGGCGGAGCTTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTC  ACCGTGTCC</p>
hAB6	VL	<p>SEQ ID NO: 100</p>

домен	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGCCTGTGACACC TGCGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCCGGTCCTCCCAGTCCATCG TGCACTCCAACGGCAACACCTACCTGGAATGGTATCTGCAGAA GCCCCGGCCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAAG CGGTTCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGG CACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGAC GTGGGCGTGTACTACTGTTTTCAAGGCTCCCACGTGCCCCTGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
-------	--

В некоторых воплощениях антигенсвязывающие белки связываются с эпитопом CCR6, где эпитоп включает аминокислоты с 1 по 28 CCR6. Предпочтительно, CCR6 является человеческим. Обычно эпитоп включает аминокислотную последовательность с 1 по 28 SEQ ID NO: 1.

#### **Мутации белков**

В данном изобретении также предложен антигенсвязывающий белок или кодирующая его нуклеиновая кислота, обладающая идентичностью по меньшей мере 80% с последовательностью, изложенной в данном документе. В одном примере антигенсвязывающий белок или нуклеиновая кислота по изобретению содержит последовательность по меньшей мере приблизительно на 85% или 90% или 95% или 97% или 98% или 99% идентичную последовательности, изложенной в данном документе.

В качестве альтернативы или дополнения антигенсвязывающий белок содержит CDR (например, три CDR) по меньшей мере приблизительно на 80% или 85% или 90% или 95% или 97% или 98% или 99% идентичные CDR в  $V_H$  или  $V_L$  как описано в данном документе в любом примере.

В другом примере нуклеиновая кислота по изобретению содержит последовательность по меньшей мере приблизительно на 80% или 85% или 90% или 95% или 97% или 98% или 99% идентичную последовательности, кодирующей антигенсвязывающий белок, имеющий функцию, как описано в данном документе в любом примере. Данное изобретение также охватывает нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающий белок по изобретению, которые отличаются от последовательности, приведенной в данном документе в качестве примера, в результате вырожденности генетического кода.

% идентичности нуклеиновой кислоты или полипептида определяют посредством анализа GAP (Needleman and Wunsch. *Mol. Biol.* 48, 443-453, 1970) (программа GCG) со штрафом за открытие гэпа = 5 и штрафом за продление гэпа = 0,3. Запрашиваемая последовательность имеет длину по меньшей мере 50 остатков, и анализ GAP выравнивает две последовательности в области по меньшей мере 50 остатков. Например, запрашиваемая последовательность имеет длину по меньшей мере 100 остатков, и анализ GAP выравнивает две последовательности в области по меньшей мере 100 остатков. Например, две последовательности выравниваются по всей их длине.

В данном изобретении также рассматривается нуклеиновая кислота, которая гибридизуется в строгих условиях гибридизации с нуклеиновой кислотой, кодирующей антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе. «Умеренная степень строгости» в данном документе определяется как гибридизация и/или отмывка, осуществляемые в 2 x SSC буфере, 0,1% (мас./об.) SDS при температуре в диапазоне от 45°C до 65°C или эквивалентных условиях. «Высокая степень строгости» в данном документе определяется как гибридизация и/или отмывка, осуществляемые в 0,1 x SSC буфере, 0,1% (мас./об.) SDS или более низкой концентрации соли и при температуре по меньшей мере 65°C или эквивалентных условиях. Указание в данном документе конкретной степени строгости охватывает эквивалентные условия с применением растворов для отмывки/гибридизации, отличных от SSC, известных специалисту в области техники. Например, в области техники известны способы для расчета температуры, при которой будут диссоциировать цепи двуцепочечной нуклеиновой кислоты (также известной как температура плавления, или  $T_m$ ). Температура, которая схожа с  $T_m$  нуклеиновой кислоты (например, в диапазоне 5°C или в диапазоне 10°C) или эквивалентна  $T_m$  нуклеиновой кислоты, считается высокой степенью строгости. Умеренной степенью строгости следует считать диапазон от 10°C до 20°C или от 10°C до 15°C от рассчитанной  $T_m$  нуклеиновой кислоты.

Данное изобретение также охватывает мутантные формы антигенсвязывающего белка по изобретению, содержащие одну или более консервативных аминокислотных замен относительно последовательности, приведенной в данном документе. В некоторых примерах антигенсвязывающий белок содержит 10 или менее, например, 9 или 8 или 7 или 6 или 5 или 4 или 3 или 2 или 1 консервативную аминокислотную замену. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при

которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь и/или гидрофобность и/или гидрофильность.

Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, определены в области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан),  $\beta$ -разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Индексы гидрофобности описаны, например, в Kyte and Doolittle *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132, 1982, а индексы гидрофильности описаны, например, в US4554101.

Данное изобретение также охватывает неконсервативные аминокислотные замены. Например, особый интерес представляют замены заряженных аминокислот другими заряженными аминокислотами и нейтральными или положительно заряженными аминокислотами. В некоторых примерах антигенсвязывающий белок содержит 10 или менее, например, 0 или 8 или 7 или 6 или 5 или 4 или 3 или 2 или 1 неконсервативную аминокислотную замену.

В одном примере мутации возникают в составе FR антигенсвязывающего домена антигенсвязывающего белка по изобретению. В другом примере мутации возникают в составе CDR антигенсвязывающего белка по изобретению.

Примеры способов получения мутантных форм антигенсвязывающего белка включают:

1. мутагенез ДНК (Thie *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 525: 309-322, 2009) или РНК (Kopsidas *et al.*, *Immunol. Lett.* 107:163-168, 2006; Kopsidas *et al.* *BMC Biotechnology*, 7: 18, 2007; и WO1999/058661);
2. внедрение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в мутаторную клетку, например, бактериальные клетки XL-1Red, XL-mutS и XL-mutS-Kanr (Stratagene);
3. перестройку ДНК, например, как изложено Stemmer, *Nature* 370: 389-91, 1994; и
4. сайт-специфический мутагенез, например, как описано Dieffenbach (ed) and Dveksler (ed) (*In: PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995).

Примеры способов для определения биологической активности мутантных антигенсвязывающих белков по изобретению будут очевидны специалисту в области техники и/или описаны в данном документе, например, связывание антигена. Например, в данном документе описаны способы для определения связывания антигена, конкурентного ингибирования связывания, аффинности, ассоциации, диссоциации и терапевтической эффективности.

В данном документе свойства аминокислот определены в следующей таблице:

<b>Аминокислота</b>	<b>3-буквенное обозначение</b>	<b>1-буквенное обозначение</b>	<b>Свойства</b>
Аланин	Ала	A	алифатическая гидрофобная нейтральная
Аргинин	Арг	R	полярная гидрофильная заряженная (+)
Аспарагин	Асн	N	полярная гидрофильная нейтральная
Аспаргат	Асп	D	полярная гидрофильная заряженная (-)
Цистеин	Цис	C	полярная гидрофобная нейтральная
Глутамин	Глн	Q	полярная гидрофильная нейтральная
Глутамат	Глу	E	полярная гидрофильная заряженная (-)
Глицин	Гли	G	алифатическая нейтральная
Гистидин	Гис	H	ароматическая полярная гидрофильная заряженная (+)
Изолейцин	Иле	I	алифатическая гидрофобная

			нейтральная
Лейцин	Лей	L	алифатическая гидрофобная нейтральная
Лизин	Лиз	K	полярная гидрофильная заряженная (+)
Метионин	Мет	M	гидрофобная нейтральная
Фенилаланин	Фен	F	ароматическая гидрофобная нейтральная
Пролин	Про	P	гидрофобная нейтральная
Серин	Сер	S	полярная гидрофильная нейтральная
Треонин	Тре	T	полярная гидрофильная нейтральная
Триптофан	Трп	W	ароматическая гидрофобная нейтральная
Тирозин	Тир	Y	ароматическая полярная гидрофобная
Валин	Вал	V	алифатическая гидрофобная нейтральная

### **Константные области**

Данное изобретение охватывает антигенсвязывающие белки и/или антитела, описанные в данном документе, содержащие константную область антитела. Сюда входят антигенсвязывающие фрагменты антитела, слитого с Fc.

Последовательности константных областей, которые могут найти применение в получении белков по данному изобретению, могут быть взяты из ряда различных источников. В некоторых примерах константная область или часть константной области белка происходит из человеческого антитела. Константная область или ее

часть может происходить из антитела любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE и антитела любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном примере константная область является человеческой изотипа IgG4 или стабилизированной константной областью IgG4.

В одном примере Fc-область константной области имеет сниженную способность индуцировать эффекторную функцию, например, по сравнению с нативной Fc-областью человеческого IgG1 или IgG3 или дикого типа. В одном примере эффекторная функция представляет собой антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Способы оценки уровня эффекторной функции белка, содержащего Fc-область, известны в области техники и/или описаны в данном документе.

В одном примере Fc-область представляет собой Fc-область IgG4 (то есть из константной области IgG4), например, Fc-область человеческого IgG4. Последовательности подходящих Fc-областей IgG4 будут очевидны специалисту в области техники и/или доступны в открытых базах данных (например, доступны в Национальном центре биотехнологической информации).

В одном примере константная область представляет собой стабилизированную константную область IgG4. Термин «стабилизированная константная область IgG4» следует понимать, как означающий константную область IgG4, которая была модифицирована для уменьшения обмена плеч Fab или склонности к обмену плечами Fab или образованию полуантитела или склонности образовывать полуантитело. «Обмен плечами Fab» относится к типу модификации белка человеческого IgG4, при которой тяжелая цепь IgG4 и присоединенная легкая цепь (половина молекулы) меняются на пару тяжелая-легкая цепь из другой молекулы IgG4. Таким образом, молекулы IgG4 могут приобретать два различных Fab плеча, распознающих два различных антигена (с образованием в результате биспецифических молекул). Обмен плечами Fab происходит естественным образом *in vivo* и может быть индуцирован *in vitro* очищенными клетками крови или восстанавливающими агентами, такими как восстановленный глутатион. «Полуантитело» образуется, когда антитело IgG4 диссоциирует с образованием двух молекул, каждая из которых содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь.

В одном примере стабилизированная константная область IgG4 содержит

пролин в положении 241 шарнирной области согласно системе Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 и/или 1991). Данное положение соответствует положению 228 шарнирной области согласно системе нумерации EU (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001 and Edelman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85, 1969). В человеческом IgG4 данный остаток, как правило, представляет собой серин. После замены серина на пролин шарнирная область IgG4 содержит последовательность CPPC. В этой связи специалисту в области техники будет известно, что «шарнирная область» представляет собой богатую пролином часть константной области тяжелой цепи антитела, которая соединяет области Fc и Fab, придающую подвижность двум Fab плечам антитела. Шарнирная область включает остатки цистеина, которые задействованы в дисульфидных связях между тяжелыми цепями. Как правило, ее определяют как участок от Glu226 до Pro243 человеческого IgG1 согласно системе нумерации Kabat. Шарнирные области IgG других изотипов можно выравнять с последовательностью IgG1, расположив первый и последний остатки цистеина, образующие дисульфидные связи (S-S) между тяжелыми цепями, в одинаковых положениях (см., например, WO2010/080538).

Дополнительные примеры стабилизированных антител IgG4 представляют собой антитела, в которых аргинин в положении 409 в константной области тяжелой цепи человеческого IgG4 (согласно системе нумерации EU) замещен лизином, треонином, метионином или лейцином (например, как описано в WO2006/033386). Fc-область константной области может содержать в качестве альтернативы или дополнения остаток, выбранный из группы, состоящей из: аланина, валина, глицина, изолейцина и лейцина в положении, соответствующем 405 (согласно системе нумерации EU). Возможно, шарнирная область содержит пролин в положении 241 (то есть последовательность CPPC) (как описано выше).

В другом примере Fc-область представляет собой область, модифицированную, чтобы обладать сниженной эффекторной функцией, то есть «не-иммуностимулирующую Fc-область». Например, Fc-область представляет собой Fc-область IgG1, содержащую замену в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из 268, 309, 330 и 331. В другом примере Fc-область представляет собой Fc-область IgG1, содержащую одну или более следующих замен E233P, L234V,



L235A и делецию G236 и/или одну или более следующих замен A327G, A330S и P331S (Armour *et al.*, *Eur J Immunol.* 29:2613-2624, 1999; Shields *et al.*, *J Biol Chem.* 276(9):6591-604, 2001). Дополнительные примеры не-иммуностимулирующих Fc-областей описаны, например в Dall'Acqua *et al.*, *J Immunol.* 177: 1129-1138 2006; и/или Hezareh *J Virol* ;75: 12161-12168, 2001).

В другом примере Fc-область представляет собой химерную Fc-область, например, содержащую по меньшей мере один домен C<sub>H</sub>2 из антитела IgG4 и по меньшей мере один домен C<sub>H</sub>3 из антитела IgG1, где Fc-область содержит замену в одном или более аминокислотных положениях, выбранных из группы, состоящей из 240, 262, 264, 266, 297, 299, 307, 309, 323, 399, 409 и 427 (нумерация EU) (например, как описано в WO2010/085682). Примеры замен включают 240 F, 262L, 264T, 266 F, 297Q, 299A, 299 K, 307P, 309 K, 309M, 309P, 323 F, 399S и 427 F.

В данном документе аминокислотный остаток в положении, эквивалентном, например, положению 234, 235 или 331 в SEQ ID NO: 60 может быть установлен любыми способами, известными специалисту в области техники. Например, выравнивание одной или более последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60 позволит специалисту в области техники установить аминокислоту в положении, эквивалентном положению 234, 235 или 331 в SEQ ID NO: 60. Специалист в области техники может сопоставить трехмерную структуру белка с трехмерной структурой белка, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и установить аминокислотный остаток, который находится в положении, эквивалентном положению 234, 235 или 331 в SEQ ID NO: 60.

#### **Белки, содержащие связывающий домен антитела**

В изобретении предложен антигенсвязывающий белок, описанный выше, где аминокислотная последовательность, образующая одно или более из FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4, происходит из человеческой последовательности или находится в форме человеческой последовательности.

Антигенсвязывающий белок может быть представлен в гуманизированной форме, включая последовательности иммуноглобулина, не являющиеся человеческими (например, грызунов) и человеческие. Как правило, последовательности CDR антигенсвязывающего белка происходят из биологических видов, отличных от человека, таких как мышь, крыса или кролик. В некоторых случаях каркасные остатки антигенсвязывающего белка также могут не являться человеческими. Когда

антигенсвязывающий белок представлен в форме целого антитела, как правило, по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc) является человеческой, тем самым обеспечивая различные человеческие эффекторные функции.

Способы гуманизации антигенсвязывающих белков, не являющихся человеческими, хорошо известны в области техники, примеры подходящих способов включают описанные Jones et al., (1986) *Nature*, 321 :522; Riechmann et al., (1988) *Nature*, 332:323; Verhoeven et al., (1988) *Science*, 239:1534.

Описанные в данном документе способы фагового дисплея с применением библиотек, происходящих из последовательностей иммуноглобулина человека, могут найти применение для создания человеческих антигенсвязывающих белков и человеческих антител.

Также, могут применяться трансгенные животные, неспособные экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но способные экспрессировать гены человеческого иммуноглобулина. Такие мыши могут быть созданы посредством случайного или специфического встраивания генов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека в эмбриональные стволовые клетки. Гены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина хозяина могут быть лишены функциональности в результате вставки или некоторого другого события рекомбинации, например, гомозиготной делеции JH области хозяина. Трансфицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят путем микроинъекции в бластоцисту с получением химерных мышей, которых затем скрещивают с получением гомозиготного потомства, экспрессирующего человеческие антигенсвязывающие белки. После иммунизации эпитопом CCR6 могут быть получены человеческие моноклональные антитела. Одним преимуществом системы трансгенных животных является то, что возможно получать терапевтически эффективные изотипы, поскольку человеческие трансгенные иммуноглобулины подвергаются перестройке в ходе дифференцировки В-клеток, а затем переключению класса и соматическим мутациям в трансгенных мышцах.

Вариабельным доменам, включающим CDR и FR по изобретению, можно придать меньшую иммуногенность путем замены экспонированных на поверхности остатков, чтобы антитело воспринималось иммунной системой как собственное. Padlan, E. A., 1991, *MoI. Immunol.* 28, 489 приводит пример способа. Как правило, аффинность сохраняется, поскольку внутренняя упаковка аминокислотных остатков вблизи

антигенсвязывающего белка остается неизменной и, как правило, остатки CDR или прилегающие остатки, влияющие на характеристики связывания, не подлежат замещению в ходе указанных процессов.

В другом воплощении предложен антигенсвязывающий белок к CCR6, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекула одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, как описано в данном документе, предпочтительно, с последовательностью, показанной в любой из Таблиц с 1 по 6.

Низкомолекулярные фрагменты антител по сравнению с целыми антителами, могут обладать улучшенным доступом к солидным опухолям и более быстрым клиренсом, что может быть особенно полезно при терапевтическом и диагностическом применении *in vivo*.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий белок представлен в форме одноцепочечного Fv фрагмента (scFv). Fv и scFv подходят для пониженного неспецифического связывания при применении *in vivo*, поскольку они имеют интактные активные центры, лишённые константных областей. Можно конструировать слитые белки, включающие scFv, обеспечивая слияние с эффекторным белком либо на амино, либо на карбокси-конце scFv.

В другом воплощении предложено диатело или триатело или иное мультиспецифическое антитело, включающее антигенсвязывающий белок, описанный выше. Мультиспецифические антитела могут быть собраны с применением полипептидных доменов, обеспечивающих мультимеризацию. Примеры включают области CH2 и CH3 из Fc и области CH1 и Скаппа/лямбда. Могут применяться другие мультимеризующиеся домены белка естественного происхождения, включая домен лейциновой застёжки (bZIP), мотив спираль-петля-спираль, домен гомологии Src (SH2, SH3), домен «EF hand», фосфотирозин-связывающий домен (PTB) или другие домены, известные в области техники.

В другом воплощении предложен слитый домен или гетерологичный белок, включающий антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, описанные в данном документе.

Гетерологичный полипептид может быть рекомбинантно слитым или химически

конъюгированным с N- или C-концом антигенсвязывающего белка или содержащей его молекулы по изобретению.

Гетерологичный полипептид, с которым слито антитело или антигенсвязывающий белок, является полезным для специфического воздействия на клетки, экспрессирующие CCR6, или найти применение для некоторых других функций, таких как очистка или увеличение времени полужизни полипептидов *in vivo* или для применения в иммуноанализе с применением способов, известных в области техники.

В предпочтительных воплощениях для удобной очистки слитого белка является полезным маркерная аминокислотная последовательность, такая как гексагистидиновый пептид. Другие включают, без ограничения, эпитоп «НА», соответствующий эпитопу, происходящему из белка гемагглютинаина вируса гриппа, и эпитоп «flag».

Кроме того, антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекула одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело по изобретению могут быть модифицированы посредством гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, присоединения клеточного лиганда или другого белка и так далее.

Антигенсвязывающие белки по изобретению могут состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями, то есть пептидные изостеры, и могут содержать аминокислоты, отличные от 20 кодируемых генами аминокислот. Антигенсвязывающие белки по изобретению могут быть модифицированы в ходе естественных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или способами химической модификации, которые хорошо известны в области техники. Такие модификации хорошо описаны в базовых документах, а также в научной литературе. Модификации могут возникать в любом месте антигенсвязывающего белка, включая пептидный остов, боковые цепи аминокислот и амино- или карбокси-концы, или в таких группировках, как углеводные. Следует понимать, что в нескольких белках один и тот же тип модификации в заданном антигенсвязывающем белке может присутствовать в одинаковой или в разной степени.

Также, антигенсвязывающий белок может содержать множество типов модификаций. Антигенсвязывающий белок может быть разветвленным. например, в результате убиквитинирования, и может быть циклическим, с разветвлением или без. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические антигенсвязывающие белки могут быть результатом естественных посттрансляционных процессов или могут быть получены синтетическими способами. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение группировки гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, введение поперечных сшивок, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных сшивок, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксихилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксигилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование, протеолитическую обработку, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование, и убиквитинирование.

В другом воплощении предложен конъюгат в форме антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, Fab, dab, scFv, диатела, триатела или слитого белка, описанных выше, конъюгированных с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, лекарственное средство, ингибитор роста, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или меткой, такой как радиоактивный изотоп (то есть радиоконъюгат). В другом аспекте изобретения дополнительно предложены способы с применением иммуноконъюгатов. В одном аспекте иммуноконъюгат содержит любой из указанных выше переменных доменов, ковалентно связанных с цитотоксическим агентом или детектируемым агентом.

В другом воплощении предложено антитело для связывания с антигенсвязывающим белком, переменным доменом иммуноглобулина, антителом, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагментом, диателом, триателом, линейным антителом, молекулой одноцепочечного антитела или мультиспецифическим антителом, слитым белком или конъюгатом, описанными выше.

В другом воплощении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок или конъюгат, описанные выше.

Полинуклеотид, кодирующий CDR или FR согласно любой из общих формул, описанных выше, или антигенсвязывающий белок содержащий их, может быть получен из нуклеиновой кислоты из любого источника, например, при помощи химического синтеза или выделения из кДНК или геномной библиотеки. Например, библиотека кДНК может быть создана из антитело-продуцирующей клетки, такой как В клетка, плазматическая клетка или гибридная клетка, и соответствующей нуклеиновой кислоты, выделенной при помощи ПЦР-амплификации с применением олигонуклеотидов, направленных против конкретного клона, представляющего интерес. Выделенные нуклеиновые кислоты затем можно клонировать в векторы с применением любого способа, известного в области техники. Соответствующие нуклеотидные последовательности могут затем быть подвергнуты мутагенезу с применением способов, известных в области техники, например, методов ДНК-рекомбинации, сайт-специфического мутагенеза, ПЦР и так далее (см., например, методики, описанные Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. и Ausubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY), с созданием антигенсвязывающих белков, имеющих различные аминокислотные последовательности, например, с созданием аминокислотных замен, делеций и/или вставок.

### **Получение белков**

В другом воплощении предложен способ получения антигенсвязывающего белка против ССР6, описанного выше, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты, описанной выше, в клетке или животном, не являющемся человеком, как описано выше.

Получение антигенсвязывающего белка по изобретению, как правило, требует экспрессирующего вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий белок по изобретению. Полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий белок по изобретению, может быть получен и субклонирован в

вектор с получением антигенсвязывающего белка при помощи технологии ДНК-рекомбинации с применением способов, хорошо известных в области техники, включая способы, описанные в данном документе. Рассматривается множество различных систем экспрессии, включая применение клеток млекопитающих, включая клетки человека для получения и секретиования антигенсвязывающих белков. Примеры клеток включают клеточные линии 293F, CHO и NSO.

Экспрессирующие векторы, содержащие белок-кодирующие последовательности и соответствующие последовательности, обеспечивающие контроль на уровне транскрипции и трансляции, могут быть сконструированы с применением способов, известных в области техники. Сюда входят методы рекомбинации ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетическая рекомбинация *in vivo*. В некоторых воплощениях предложен реплицируемый вектор, имеющий нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок, функционально связанный с промотором.

Клетки, трансфицированные экспрессирующим вектором, можно культивировать стандартными методиками для получения антигенсвязывающего белка. Так, в некоторых воплощениях предложены клетки-хозяева или трансфицированные клетки, содержащие полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий белок по изобретению, функционально связанный с промотором. Промотор может быть гетерологичным. Можно применять многообразные системы хозяин-экспрессирующий вектор, и в некоторых системах транскрипционные механизмы системы вектора особенно подходят клетке-хозяину. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO) могут быть трансфицированы вектором, включающим промоторный элемент главного предраннего гена из цитомегаловируса человека. В качестве дополнения или альтернативы может применяться клетка-хозяин, которая регулирует экспрессию встроенных последовательностей или осуществляет модификацию и процессинг продукта гена должным образом, включая различные формы пост-трансляционной модификации. Примеры клеток-хозяев млекопитающих, имеющих конкретные процессы пост-трансляционной модификации, включают клетки CHO, VERY, ВНК, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 and T47D, NSO, CRL7030 и HsS78Bst.

В зависимости от предполагаемого применения молекулы белка можно с успехом отбирать ряд векторов для экспрессии в бактериях. В одном примере могут

применяться векторы, которые обеспечивают высокие уровни экспрессии слитых белковых продуктов, которые легко очищать, такие как вектор pUR278 для экспрессии в *E. coli*, когда необходимо производить большое количество антигенсвязывающего белка. Продукт экспрессии может быть получен в форме слитого с lacZ белка. Другие векторы для бактерий включают векторы pIN и ему подобные. Также могут применяться векторы pGEX для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых с глутатион-S-трансферазой (GST) белков. Такие слитые белки обычно являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток посредством адсорбции и связывания с аффинным матриксом на основе агарозы с присоединенным глутатионом с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. В экспрессируемом полипептиде может быть представлен сайт расщепления протеазами тромбином и/или фактором Ха, чтобы клонированный целевой генный продукт мог освобождаться от группировки GST.

В качестве вектора для экспрессии чужеродных генов в системе насекомых, включая клетки *Spodoptera frugiperda*, может применяться вирус ядерного полиэдроза совки калифорнийской люцерновой (AcNPV). Конкретный используемый промотор может зависеть от того, где в последовательность встроена белок-кодирующая последовательность. Например, последовательность может быть клонирована индивидуально в ген полиэдрина и помещена под контроль промотора полиэдрина.

С клетками млекопитающих могут применяться системы экспрессии на основе вируса, такого как аденовирус, где кодирующая последовательность, представляющая интерес, может быть лигирована с поздним промотором и состоящей из трех экзонов лидерной последовательностью аденовируса. Для встраивания этого химерного гена в геном аденовируса в дальнейшем может применяться рекомбинация *in vitro* или *in vivo*. Встраивание в область E1 или E3 приведет к жизнеспособному рекомбинантному вирусу, способному экспрессировать антигенсвязывающий белок в инфицированных клетках-хозяевах. Для эффективной трансляции встроженных последовательностей, кодирующих антигенсвязывающий белок, могут требоваться специфические иницирующие сигналы, включающие иницирующий кодон ATG и прилежащие последовательности. Последовательности, обеспечивающие контроль инициации и трансляции, могут иметь различное происхождение, как естественное, так и синтетическое. Для увеличения эффективности экспрессии системы на основе вируса могут применяться элементы-энхансеры транскрипции и терминаторы трансляции.



Когда требуется длительное получение рекомбинантных белков с высоким выходом, предпочтительна стабильная экспрессия. Как правило, применяют селектируемый маркерный ген, когда после трансфекции клетки выращивают в течение 1-2 дней в обогащенной среде и затем переносят в среду, содержащую селективную среду, в которой можно осуществлять скрининг клеток, содержащих соответствующий селектируемый маркер, например, устойчивость к антибиотикам. В результате клетки, которые стабильно интегрировали плазмиду в свои хромосомы, растут и образуют колонии, которые в свою очередь могут быть клонированы и размножены в клеточные линии. Гены тимидинкиназы вируса простого герпеса, гипоксантинуанин фосфорибозилтрансферазы и аденин фосфорибозилтрансферазы являются примерами генов, которые могут применяться в tk-, hgp<sup>r</sup>t- или arg<sup>r</sup>T- клетках, соответственно, тем самым обеспечивая надлежащие системы селекции. Селективные гены: dhf, придающий устойчивость к метотрексату; gpt, придающий устойчивость к микофеноловой кислоте; neo, придающий устойчивость к аминогликозиду G-418; и hyg<sup>r</sup>, придающий устойчивость к гигромицину, являются примерами генов, которые могут применяться в системах отбора с использованием антиметаболитов.

Антигенсвязывающий белок по изобретению можно очищать с применением рекомбинантной системы экспрессии известными способами, включающими ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию (особенно аффинную к специфическим антигенам белку А или белку G) и гель-фильтрационную колоночную хроматографию), центрифугирование, различную растворимость, или с применением любой другой стандартной методики для очистки белков. Представление антигенсвязывающего белка в форме слитого белка может облегчать очистку или способствовать очистке.

Большие количества антигенсвязывающих белков по изобретению могут быть получены в масштабируемом процессе, начинающемся с пилотной системы экспрессии в исследовательской лаборатории, которая масштабируется до биореактора аналитического масштаба (как правило, биореакторы от 5 л до приблизительно 50 л) или биореакторов промышленного масштаба (например, 75 л, 100 л, 150 л, 300 л или 500 л, без ограничения). Желательные масштабируемые процессы включают такие, где уровни агрегации по данным HPSEC or rCGE являются от низких до недетектируемых, как правило, от не более чем 5% агрегации белка по массе до не более чем 0,5% агрегации белка по массе. В качестве дополнения или альтернативы, недетектируемые

уровни фрагментации, измеренные по показателю общей площади пиков представляют интактный антигенсвязывающий белок и могут быть желательными для масштабирования процесса, чтобы интактный антигенсвязывающий белок был представлен по меньшей мере 80% и до 99,5% или более от общей площади пиков. В других воплощениях масштабированный процесс по изобретению позволяет получить антигенсвязывающие белки с эффективностью получения от приблизительно 10 мг/л до приблизительно 300 мг/л или выше.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные методики, включающие протеолитическое расщепление интактных антител и рекомбинантную экспрессию в клетках-хозяевах. Применительно к последним, как описано ниже, все фрагменты антител Fab, Fv и scFv могут экспрессироваться и секретироваться *E. coli*, фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, а фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub>. В другом подходе F(ab')<sub>2</sub> фрагменты выделяют непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев.

В другом воплощении предложен вектор, включающий нуклеиновую кислоту, описанную выше. Вектор может, например, быть в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага. Соответствующая нуклеиновокислотная последовательность может быть встроена в вектор различными способами. Как правило, ДНК встраивают между соответствующими сайтами рестрикционных эндонуклеаз с применением методик, известных в области техники. Компоненты вектора, как правило, включают, без ограничения, одну или более сигнальных последовательностей, ориджин репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. Конструирование подходящих векторов, содержащих один или более указанных компонентов включает стандартные методики лигирования, которые известны специалисту в области техники.

Антигенсвязывающий сайт может быть получен рекомбинантным способом, не только в непосредственном виде, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, который может быть сигнальной последовательностью или другим полипептидом, имеющим специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Как правило, сигнальная последовательность может представлять собой компонент вектора или она может быть частью встроенной в

вектор ДНК, кодирующей антигенсвязывающий сайт. Сигнальная последовательность может представлять собой прокариотическую сигнальную последовательность, выбранную, например, из группы лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II. Для секреции дрожжами сигнальная последовательность может быть, например, лидерной последовательностью инвертазы дрожжей, лидерной последовательностью альфа-фактора или лидерной последовательностью кислой фосфатазы или лидерной последовательностью глюкоамилазы *S. albicans*. При экспрессии в клетках млекопитающих для управления секрецией белка могут применяться сигнальные последовательности млекопитающих, такие как сигнальные последовательности из секретируемых полипептидов того же или родственных биологических видов, а также обеспечивающие секрецию лидерные последовательности вирусов.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антигенсвязывающего белка по изобретению, могут быть получены с применением стандартных рекомбинантных методик, как описано выше. Полинуклеотиды могут быть синтезированы с применением синтезатора нуклеотидов или методик ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в рекомбинантный вектор, способный реплицировать и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. В области техники известно множество векторов, которые могут применяться для задач данного изобретения. Выбор соответствующего вектора будет зависеть в основном от размера нуклеиновых кислот, которые необходимо встроить в вектор, и от конкретной клетки-хозяина, которую необходимо трансформировать вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты, в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида или и то, и другое) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится.

Как правило, с такими хозяевами применяются плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, происходящие из видов, совместимых с клеткой-хозяином. Как экспрессирующие, так и клонирующие векторы содержат нуклеиновокислотную последовательность, позволяющую вектору реплицироваться в одной или более выбранных клетках-хозяевах, а также маркерные последовательности, которые способны обеспечить отбор трансформированных клеток по фенотипу. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий,

дрожжей и вирусов. Ориджин репликации из плазмиды pBR322, содержащей гены устойчивости к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и поэтому обеспечивающей простое средство обнаружения трансформированных клеток, подходит для большинства грамотрицательных бактерий, ориджин 2 мкм плазмиды подходит для дрожжей, а различные ориджины вирусов (SV40, полиомы, аденовируса, VSV или BPV) эффективны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. pBR322, его производные или другие плазмиды микроорганизмов или бактериофагов могут также содержать, или быть модифицированными, чтобы содержать, промоторы, которые могут использоваться микроорганизмами для экспрессии эндогенных белков.

Кроме того, в качестве трансформирующих векторов вместе с указанными хозяевами могут применяться фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином. Например, такие бактериофаги, как  $\lambda$ GEM.TM.-11, могут применяться в создании рекомбинантного вектора, который может применяться для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

Экспрессирующий вектор по изобретению может содержать две или более пар промотор-цистрон (цистрон представляет собой сегмент ДНК, содержащий всю информацию для получения одного полипептида). Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную в направлении против хода транскрипции (5') относительно цистрона, модулирующую его экспрессию. Прокариотические промоторы, как правило, разделяют на два класса, индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона под своим контролем в ответ на изменения условий культивирования, например, наличие или отсутствие нутриента или изменение температуры.

Известно большое количество промоторов, распознающихся различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор может быть функционально связан с ДНК цистрона, кодирующей легкую или тяжелую цепи, в результате удаления промотора из ДНК-источника посредством расщепления рестрикционным ферментом и встраивания выделенной последовательности промотора в вектор по изобретению. Для управления амплификацией и/или экспрессией целевых генов можно применять как последовательность нативного промотора, так и многочисленные гетерологичные промоторы. В некоторых воплощениях применяются

гетерологичные промоторы, поскольку они, как правило, обеспечивают лучшую транскрипцию и более высокий выход экспрессируемого целевого гена по сравнению с нативным промотором целевого полипептида.

Хорошо известны промоторы, распознающиеся различными потенциальными клетками-хозяевами. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, системы  $\beta$ -галактамазного и лактозного промоторов, системы промоторов щелочной фосфатазы, триптофана (trp) и гибридные промоторы, такие как промоторы tac или trc. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей антигенсвязывающий белок по изобретению. Однако, также подходящими являются другие промоторы, которые являются функциональными в бактериях (такие как другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности опубликованы, что позволяет специалисту в области техники осуществлять их функциональное лигирование с цистронами, кодирующими целевые легкую и тяжелую цепи, с использованием линкеров или адапторов для обеспечения любого необходимого сайта рестрикции.

В одном аспекте изобретения каждый цистрон в составе рекомбинантного вектора содержит компонент, обеспечивающий секрецию сигнальной последовательности, направляющий транслокацию экспрессированных полипептидов через мембрану. Как правило, сигнальная последовательность может представлять собой компонент вектора или она может быть частью встроенной в вектор ДНК, кодирующей целевой полипептид. Сигнальная последовательность, отобранная для целей данного изобретения, должна быть такой, которая распознается и подвергается процессингу (то есть расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. В случае прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не осуществляют процессинг сигнальных последовательностей, являющихся нативными для гетерологичных полипептидов, сигнальная последовательность замещается сигнальной последовательностью прокариот, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PeIB, OmpA и MBP. В одном воплощении изобретения сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах экспрессирующей системы, представляют собой сигнальные

последовательности STII или их варианты.

В другом аспекте продуцирование иммуноглобулинов по изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина, и таким образом, не требует присутствия обеспечивающих секрецию сигнальных последовательностей в каждом цистроне. При этом легкая и тяжелая цепи иммуноглобулинов экспрессируются, сворачиваются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Некоторые штаммы-хозяева (например, штаммы *E. coli* trxB) обеспечивают условия в цитоплазме, благоприятствующие образованию дисульфидных связей, тем самым обеспечивая корректную укладку и сборку экспрессированных субъединиц белка.

В данном изобретении предложена система экспрессии, в которой количественное отношение экспрессируемых полипептидных компонентов можно модулировать для максимизации выхода секретлируемых и надлежащим образом собранных антигенсвязывающих белков по изобретению. Такая модуляция осуществляется по меньшей мере отчасти посредством одновременного модулирования интенсивности трансляции полипептидных компонентов.

Если говорить об экспрессии в эукариотических клетках-хозяевах, компоненты вектора, как правило, включают, без ограничения, одно или более из следующего: сигнальную последовательность, ориджин репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида, представляющего интерес. Отобранная гетерологичная сигнальная последовательность, предпочтительно, может быть такой, которая распознается и подвергается процессингу (то есть расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для экспрессии в клетках млекопитающих существуют сигнальные последовательности млекопитающих, а также обеспечивающие секрецию лидерные последовательности вирусов, например, сигнальная последовательность гликопротеина D (gD) вируса простого герпеса.

ДНК для такой предшествующей области лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитело.

Как правило, для экспрессирующих векторов млекопитающих компонент ориджина репликации не требуется. Например, ориджин SV40, как правило, может

применяться только потому что он содержит ранний промотор.

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат ген, по которому ведут отбор, также называемый селективируемым маркером. Типичные гены, по которым ведут отбор, кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) компенсируют ауксотрофию или (в) обеспечивают ключевые нутриенты, отсутствующие в комплексной среде, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

В одном примере схемы отбора используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые были успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и поэтому выживают в селективных условиях. В примерах такой доминантной селекции применяются лекарственные средства неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин.

Примерами подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются те, которые позволяют обнаружить компетентные клетки для приема нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенсвязывающий белок, такие как DHFR или тимидинкиназа, металлотioneин-I и -II, предпочтительно, гены металлотioneина приматов, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и так далее. Когда применяют DHFR дикого типа, соответствующей клеткой-хозяином является линия клеток CHO с дефектом активности DHFR (например, ATCC CRL-9096), полученных и размноженных. Например, вначале обнаруживают клетки, трансформированные геном DHFR, по которому ведут отбор, путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В альтернативном варианте клетки-хозяева (особенно, клетки-хозяева дикого типа, содержащие эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид 3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать при росте клеток в среде, содержащей селективный агент для селективируемого маркера, такого как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418.

Экспрессирующие и клонирующие векторы обычно содержат промотор, функционально связанный с антигенсвязывающим белком, кодирующим

нуклеиновокислотную последовательность для управления синтезом мРНК. Хорошо известны промоторы, распознающиеся различными потенциальными клетками-хозяевами.

Эукариотические гены обычно имеют область, богатую АТ, расположенную в направлении против хода транскрипции на расстоянии приблизительно на 25-30 оснований от сайта инициации транскрипции. Другая последовательность, обнаруживаемая в направлении против хода транскрипции на расстоянии от 70 до 80 оснований от старта транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3' конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигнальной последовательностью для добавления поли-А хвоста на 3' конец кодирующей последовательности. Все эти последовательности удобно встраиваются в эукариотические экспрессирующие векторы.

Примеры подходящих последовательностей промоторов для применения с хозяевами дрожжами включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, включая енолазу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, гексокиназу, пируватдекарбоксилазу, фосфофруктокиназу, глюкозо-6-фосфатизомеразу, 3-фосфоглицератмутазу, пируваткиназу, триозофосфатизомеразу, фосфоглюкозоизомеразу и глюкокиназу.

Другие промоторы дрожжей, представляющие собой индуцибельные промоторы, дополнительным преимуществом которых является транскрипция, контролируемая условиями культивирования, представляют собой промоторные области для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, расщепляющих ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотioneина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы.

Транскрипция антигенсвязывающего белка из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, и из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы



совместимы с системами клеток-хозяев.

Транскрипция ДНК, кодирующей антигенсвязывающий белок, высшими эукариотами может быть усилена путем встраивания в вектор энхансерной последовательности. Энхансерные последовательности включают известные из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина,  $\alpha$ -фетопротейна и инсулина). Однако, как правило, будет применяться энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на участке позднего начала репликации (100-270 пн), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на участке позднего начала репликации и энхансеры аденовируса.

Экспрессирующие векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или содержащих ядра клеток из других многоклеточных организмов) будут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК). Такие последовательности обычно имеются в 5'-, а иногда 3'-нетранслируемых областях эукариотической или вирусной ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антигенсвязывающий белок.

В другом воплощении предложена клетка, включающая вектор или нуклеиновую кислоту, описанные выше. Молекула нуклеиновой кислоты или вектор могут присутствовать в генетически модифицированной клетке-хозяине или хозяине либо в виде независимой молекулы за пределами генома, предпочтительно, в виде молекулы, способной к репликации, либо они могут быть стабильно интегрированы в геном клетки-хозяина или хозяина.

Клетка-хозяин по данному изобретению может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой.

Примерами прокариотических клеток являются обычно используемые для клонирования, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*. Кроме того, эукариотические клетки включают, например, клетки грибов или клетки животных.

Примерами подходящих клеток грибов являются клетки дрожжей, предпочтительно, рода *Saccharomyces*, и наиболее предпочтительно, виды *Saccharomyces cerevisiae*.

Примерами клеток животных являются, например, клетки насекомых, клетки позвоночных, предпочтительно, клетки млекопитающих, такие как, например, НЕК293,

NSO, CHO, MDCK, U2-OS, Hela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Skn-sh, CaSki, C33A. Эти клетки-хозяева, например, клетки CHO, могут обеспечивать пост-трансляционные модификации молекул антител по изобретению, включая удаление лидерного пептида, укладку и сборку H (тяжелой) и L (легкой) цепей, гликозилирование молекулы в надлежащих сайтах и секрецию функциональной молекулы.

Дополнительные подходящие линии клеток, известные в области техники, могут быть получены из депозитариев клеточных линий, таких как Американская коллекция типовых культур (ATCC).

В другом воплощении предложено животное, включающее клетку, описанную выше. В некоторых воплощениях животные и их ткани, содержащие трансген, могут найти применение в получении антигенсвязывающих белков по изобретению. Внедрение молекул нуклеиновых кислот в качестве трансгенов в хозяев, не являющихся человеком, и их последующая экспрессия могут применяться для получения антигенсвязывающих белков, например, экспрессия такого трансгена в молоке трансгенного животного обеспечивает средства для получения антигенсвязывающих белков в количествах, поддающихся количественному определению. Полезные в данной связи трансгены содержат молекулы нуклеиновых кислот по изобретению, например, кодирующие последовательности для описанных в данном документе антигенсвязывающих белков, функционально связанные с промоторными и/или энхансерными структурами из специфического гена молочной железы, такого как казеин или бета-лактоглобулин. Животное может быть млекопитающим, не являющимся человеком, наиболее предпочтительно, мышами, крысами, овцами, телятами, собаками, мартышками или человекообразными обезьянами.

### **Композиции**

В некоторых примерах антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, можно вводить перорально, парентерально, посредством аэрозоля для ингаляции, адсорбции, абсорбции, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально, интравентрикулярно, через имплантируемый резервуар, в дозированных лекарственных формах, содержащих стандартные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, или в любой другой удобной лекарственной форме. Термин «парентерально» в данном документе включает техники подкожной, внутривенной,

внутримышечной, внутривенной, внутривенной, внутрибрюшинной, внутриоболочечной, внутрижелудочковой, внутригрудной и внутричерепной инъекции или инфузии.

Способы получения антигенсвязывающего белка в подходящей форме для введения субъекту (например, фармацевтической композиции) известны в области техники и включают, например, способы, описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) и Фармакопее США: National Formulary (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1984).

Фармацевтические композиции по изобретению особенно полезны для парентерального введения, такого как внутривенное введение или введение в полость тела или полость органа или сустава. Композиции для введения будут обычно содержать раствор антигенсвязывающего белка, растворенного в фармацевтически приемлемом носителе, например, водном носителе. Могут применяться разнообразные водные носители, например, забуференный физиологический раствор и тому подобные. Композиции могут содержать вспомогательные фармацевтически приемлемые вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как вещества для корректировки рН и буферизирующие вещества, вещества для корректировки токсичности и тому подобные, например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и тому подобные. Концентрация антигенсвязывающего белка по данному изобретению в этих составах может широко варьировать, и будет выбрана преимущественно на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и тому подобного в соответствии с конкретным выбранным способом введения и нуждами пациента. Примеры носителей включают воду, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Также могут применяться неводные носители, такие как смешанные масла и этилолеат. В качестве носителей также могут применяться липосомы. Несущие среды могут содержать небольшие количества вспомогательных веществ, которые усиливают изотоничность и химическую стабильность, например, буферы и консерванты.

После приготовления в виде препарата антигенсвязывающий белок по данному изобретению будут вводить совместимым с дозированной лекарственной формой образом и в таком количестве, которое является терапевтически/профилактически эффективным. Составы легко вводить в виде различных лекарственных форм, таких как типы инъекционных растворов, описанные выше, однако также рассматриваются другие фармацевтически приемлемые формы, например, таблетки, пилюли, капсулы

или другие твердые формы для перорального введения, суппозитории, пессарии, назальные растворы или спреи, аэрозоли, средства для ингаляции, липосомальные формы и тому подобные. Также могут применяться фармацевтические капсулы или композиции «с замедленным высвобождением». Составы с замедленным высвобождением, как правило, создаются для обеспечения постоянного уровня лекарственного средства на протяжении продолжительного периода времени и могут применяться для доставки антигенсвязывающего белка по данному изобретению.

WO2002/080967 описывает композиции и составы для введения аэрозольных композиций, содержащих антитела для лечения, например, астмы, которые также подходят для введения антигенсвязывающего белка по данному изобретению.

В другом воплощении также предложена фармацевтическая композиция, включающая антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок или конъюгат, описанные выше, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Хотя изобретение находит применение у человека, изобретение также можно применять в диагностических или терапевтических целях в ветеринарии. Изобретение является полезным для домашних или сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, лошади и домашняя птица; для животных-компаньонов, таких как кошки и собаки; и для животных зоопарков.

Способы получения и введения антигенсвязывающих белков субъекту, которому это необходимо, хорошо известны или легко устанавливаются специалистами в области техники. Путь введения антигенсвязывающего белка может быть пероральным, парентеральным, посредством ингаляции или местным.

Тогда как все указанные формы введения несомненно считаются входящими в объем изобретения, формой для введения будет раствор для инъекций, в частности, для внутривенной или внутриаартериальной инъекции или инфузии. Как правило, подходящая композиция для инъекций может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), возможно, стабилизирующее вещество (например, человеческий альбумин) и так далее.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или

неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. В данном изобретении фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, 0,01-0,1 М и предпочтительно 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Другие типичные парентеральные несущие среды включают растворы фосфата натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, Рингер-лактат или нелетучие масла. Несущие среды для внутривенного введения включают вещества для восполнения жидкости и питательных веществ, вещества для восполнения электролитов, такие как на основе раствора Рингера с декстрозой, и тому подобные. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, например, такие как antimicrobные вещества, антиоксиданты, хелатирующие вещества, инертные газы и тому подобные.

Более конкретно, фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед применением, в таких случаях композиция может быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, которая обеспечивает возможность легкого введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и предпочтительно будет предохранена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин), пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобные) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, благодаря применению покрытия, такого как лецитин, поддержанию необходимого размера частиц в случае дисперсий и применению поверхностно-активных веществ. Подходящие составы для применения в терапевтических способах, изложенных в данном документе, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16th ed. (1980).

Предупреждение действия микроорганизмов может достигаться при помощи различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов,

хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, мертиолята и тому подобных. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может достигаться включением в композицию вещества, замедляющего всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем введения действующего вещества (например, антигенсвязывающего белка) в необходимом количестве в надлежащий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных в данном документе, как это необходимо, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем введения действующего вещества в стерильную несущую среду, которая содержит базовую дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием. Инъекционные препараты для инъекций проводят через технологический процесс, заполняют в контейнеры, такие как ампулы, мешки, бутылки, шприцы или флаконы и герметизируют в асептических условиях в соответствии со способами, известными в области техники. Кроме того, препараты можно упаковывать и продавать в форме набора. Такие изделия предпочтительно будут иметь этикетки или вложенные в упаковку инструкции по применению, где указано, что сопровождающие композиции могут полезны в лечении субъекта, страдающего нарушением или имеющего предрасположенность к нарушению.

#### **Дозировки и время введения**

Подходящие дозировки антигенсвязывающего белка по данному изобретению будут варьировать в зависимости от специфического антигенсвязывающего белка, состояния, подлежащего лечению и/или субъекта, получающего лечение. Определение подходящей дозировки находится в компетенции специалиста в области техники, например, начиная с суб-оптимальной дозировки и постепенно изменяя дозировку с определением оптимальной или полезной дозировки. В качестве альтернативы, для

определения надлежащей дозировки для лечения/предупреждения применяют данные анализа культуры клеток или исследований на животных, где подходящая доза находится в диапазоне концентраций в циркуляции, которые включают ED<sub>50</sub> активного соединения при низкой токсичности или отсутствии токсичности. Дозировка может варьировать в указанном диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Терапевтически/профилактически эффективную дозу можно первоначально оценить по исследованиям на культуре клеток. В моделях на животных можно приготовить дозу для достижения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, включающих IC<sub>50</sub> (то есть концентрацию или количество соединения, позволяющих достичь полумаксимального ингибирования симптомов), установленную на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения полезных дозировок у человека. Уровни в плазме можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В некоторых примерах способ по данному изобретению включает введение профилактически или терапевтически эффективного количества белка, описанного в данном документе.

Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, которое при введении субъекту, нуждающемуся в лечении, улучшает прогноз и/или состояние субъекта и/или уменьшает или подавляет один или более симптомов клинического состояния, описанного в данном документе, до уровня, который будет ниже наблюдающегося и считающегося диагностическим или характерным с клинической точки зрения для данного состояния. Количество, вводимое субъекту, будет зависеть от конкретных характеристик состояния, подлежащего лечению, типа и стадии состояния, лечение которого осуществляют, способа введения и характеристик субъекта, таких как общее состояние здоровья, другие заболевания, возраст, пол, генотип и масса тела. Специалист в области техники будет способен установить надлежащие дозировки в зависимости от указанных и других факторов. Соответственно, данный термин не должен считаться ограничивающим данное изобретение определенным количеством, например, массой или количеством белка(ов), изобретение скорее охватывает любое количество антигенсвязывающего(их) белка(ов), достаточное для достижения у субъекта указанного результата.

В данном документе термин «профилактически эффективное количество» следует понимать, как означающий достаточное количество белка для предупреждения или подавления или задержки развития одного или более детектируемых симптомов клинического состояния. Специалисту в области техники будет известно, что такое количество будет варьировать, например, в зависимости от вводимого специфического антигенсвязывающего(их) белка(ов) и/или конкретного субъекта и/или типа или тяжести или выраженности состояния и/или предрасположенности (генетической или иной) состоянию. Соответственно, данный термин не должен считаться ограничивающим данное изобретение определенным количеством, например, массой или количеством белка(ов), изобретение скорее охватывает любое количество антигенсвязывающего(их) белка(ов), достаточное для достижения указанного результата у субъекта.

Эффективные дозы композиций по данному изобретению для лечения нарушений, как описано в данном документе, варьирует в зависимости от множества различных факторов, включая средства введения, целевой участок, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарств и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациент является человеком, но также можно осуществлять лечение млекопитающих, не являющихся людьми, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозировки можно титровать с применением рутинных способов, известных специалисту в области техники, для оптимизации безопасности и эффективности.

Для лечения некоторых нарушений антигенсвязывающим белком, дозировка может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг, и чаще от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, и так далее) массы тела хозяина. Например, дозировка может составлять от 1 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг, предпочтительно по меньшей мере 1 мг/кг. В объем изобретения также входят промежуточные дозировки в указанных диапазонах. Субъектам можно вводить такие дозировки ежедневно, через день, еженедельно или в соответствии с любой другой схемой, определенной эмпирическим анализом. Примеры лечения охватывают введение множества доз в течение пролонгированного периода, например, по меньшей мере в течение шести месяцев. Дополнительные приведенные в качестве примера схемы лечения предусматривают введение один раз в две недели или один раз



в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев. Приведенные в качестве примера схемы введения включают 1-10 мг/кг или 15 мг/кг в ежедневно, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг раз в неделю. В некоторых способах два или более антигенсвязывающих белков с различной специфичностью связывания вводят одновременно, в этом случае дозировка каждого вводимого антигенсвязывающего белка входит в указанные диапазоны.

Изложенный в данном документе антигенсвязывающий белок можно вводить многократно. Интервалы между однократными введениями могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, индикатором будет служить измерение уровней целевого полипептида или целевой молекулы в крови пациента. В некоторых воплощениях дозировку корректируют для достижения концентрации полипептида в плазме 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах 25-300 мкг/мл. В качестве альтернативы, антигенсвязывающие белки можно вводить в виде состава с пролонгированным высвобождением, в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от времени полужизни антигенсвязывающего белка у пациента. Время полужизни антигенсвязывающего белка также можно пролонгировать посредством слияния со стабильным полипептидом или группировкой, например, альбумином или ПЭГ. Как правило, гуманизированные антитела демонстрируют наибольшее время полужизни, за ними следуют химерные антитела и антитела, не являющиеся человеческими. В одном воплощении антигенсвязывающий белок по изобретению можно вводить в неконъюгированной форме. В другом воплощении антигенсвязывающий белок для применения в способах, изложенных в данном документе, можно вводить многократно в конъюгированной форме. В еще одном воплощении антигенсвязывающие белки по изобретению можно вводить в неконъюгированной форме, затем в конъюгированной форме или наоборот.

Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли воздействие профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях композиции, содержащие антитела или их коктейли, вводят пациенту еще не на стадии заболевания или на доклинической стадии заболевания для усиления сопротивляемости пациента. Такое количество определяют как «профилактически эффективную дозу». При таком применении точное количество вновь зависит от состояния здоровья пациента и общего иммунитета, но как правило варьирует от 0,1 до 25 мг на дозу, в частности, от 0,5 до 2,5 мг на дозу. Относительно низкую дозу вводят с относительно редкими интервалами в течение длительного

периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение пожизненно.

При терапевтических применениях иногда требуются относительно высокие дозы (например, от приблизительно 1 до 400 мг/кг связывающейся молекулы, например, антигенсвязывающего белка на дозу, при этом наиболее часто применяются дозировки от 5 до 25 мг для радиоиммуноконъюгатов и более высокие дозы для молекул конъюгатов цитотоксического и лекарственного средства) с относительно короткими интервалами, до замедления или остановки прогрессирования заболевания, и предпочтительно до того, как у пациента не произойдет частичное или полное улучшение симптомов заболевания. Затем пациенту можно осуществлять введение согласно профилактической схеме.

В одном воплощении субъекта можно лечить с применением молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенсвязывающий белок (например, в векторе). Дозировки нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, варьируют от приблизительно 10 нг до 1 г, от 100 нг до 100 мг, от 1 мкг до 10 мг или 30-300 мкг ДНК на пациента. Дозировки для векторов на основе инфекционных вирусных частиц варьируют от 10-100 или более вирионов на дозу.

Терапевтические агенты можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, интракраниальным, внутрибрюшинным, интраназальным или внутримышечным способами для профилактического и/или терапевтического воздействия, в некоторых способах осуществляют инъекцию агентов непосредственно в конкретную ткань, когда произошло накопление ССР6 клеток, например, посредством внутрочерепной инъекции. В некоторых случаях для введения антитела предпочтительны внутримышечная инъекция или внутривенная инфузия, конкретные терапевтические антитела вводят путем инъекции непосредственно в череп, в некоторых способах антитела вводят в виде композиции или устройства с пролонгированным высвобождением.

Возможно, антигенсвязывающий белок по изобретению можно вводить в комбинации с другими агентами, которые эффективны в лечении нарушения или состояния, требующего лечения (например, профилактически или терапевтически).

В другом воплощении предложена фармацевтическая композиция, включающая антигенсвязывающий белок, вариабельный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, слитый белок или конъюгат,

описанные выше, разбавитель и, возможно, метку. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения псориаза предпочтительно предназначена для местного введения.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающие белки или включающие их молекулы несут детектируемую метку. Можно применять множество различных меток, включая ферменты или включающие их молекулы, радиоактивные изотопы, коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения и биолюминесцентные соединения. Можно применять флуорохромы (флуоресцеин, родамин, техасский красный и так далее), ферменты (пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, щелочная фосфатаза и так далее), радиоактивные изотопы ( $^{32}\text{P}$  или  $^{125}\text{I}$ ), биотин, дигоксигенин, коллоидные металлы, хеми- или биолюминесцентные соединения (диоксэтаны, люминол или соединения акридина).

Способы детекции зависят от типа использованной метки и включают автордиографию, флуоресцентную микроскопию, прямые и непрямые ферментативные реакции. Примеры включают вестерн-блоттинг, тесты на связывание белков на мембране в ренатурирующих условиях, RIA (радиоиммуноанализ) и IRMA (иммунорадиометрический анализ), EIA (иммуноферментный анализ), ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ), FIA (флуоресцентный иммуноанализ) и CLIA (хемилюминесцентный иммуноанализ).

### **Наборы**

В другом воплощении предложен набор или изделие, включающее антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные выше.

В других воплощениях предложен набор для применения в терапевтических целях, как упомянуто выше, набор включает:

- контейнер, несущий терапевтическую композицию в форме одного или более из антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела, слитого белка, конъюгата или фармацевтической композиции;

- этикетку или листовку-вкладыш с инструкциями по применению.

В некоторых воплощениях набор может содержать один или более дополнительных действующих веществ или ингредиентов для лечения рака или предупреждения осложнений, связанных с раком, описанных выше, или состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6.

Набор или «изделие» могут содержать контейнер и этикетку или листовку-вкладыш на контейнере или в ассоциации с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, блистерные упаковки и так далее. Контейнеры могут быть из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер несет терапевтическую композицию, которая эффективна для лечения состояния, и может иметь порт для стерильного доступа (например, контейнер может быть мешком для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, протыкаемую иглой для подкожных инъекций). На этикетке или листовке-вкладыше указано, что терапевтическая композиция применяется для лечения выбранного состояния. В одном воплощении этикетка или листовка-вкладыш содержат инструкции по применению и указывают, что терапевтическая композиция может применяться для лечения, предупреждения или обнаружения заболевания или состояния, характеризующего экспрессией CCR6.

Набор может содержать (а) терапевтическую композицию; и (б) второй контейнер со вторым действующим веществом или ингредиентом, который в нем находится. Набор в этом воплощении изобретения может содержать листовку-вкладыш, на котором указано, что для лечения нарушения или предупреждения осложнения, являющегося следствием злокачественного заболевания, может применяться другое действующее вещество. В качестве дополнения или альтернативы набор может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

В некоторых воплощениях терапевтическая композиция может быть представлена в форме одноразового или многоразового устройства, включающего резервуар, в котором находится терапевтическая композиция. В одном воплощении устройство представляет собой шприц. Устройство может нести 1-2 мл

терапевтической композиции. Терапевтическая композиция может быть представлена в устройстве в состоянии, готовом для применению или в состоянии, требующем смешивания или добавления дополнительных компонентов.

В других воплощениях предложен набор для применения в диагностических приложениях, упомянутых выше, набор включает:

- контейнер, несущий диагностическую композицию в форме одного или более из антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, Fab, dab, scFv, диатела, триатела, слитого белка или конъюгата;

- этикетку или листовку-вкладыш с инструкциями по применению.

Набор может содержать (а) диагностическую композицию; и (б) второй контейнер со вторым диагностическим агентом или второй меткой, которая в нем находится. Он может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры и так далее.

#### **Состояния, подлежащие лечению или диагностике**

В другом воплощении предложен способ лечения у индивидуума предупреждения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CCR6, включающий стадию, на которой индивидууму, нуждающемуся в лечении указанного состояния, дают антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, Fab, dab, scFv, диатело, триатело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе. Как правило, состояние представляет собой воспалительное состояние, инфекцию, фиброз или рак, в частности, эпителиального происхождения, как описано в данном документе, или легочные нарушения, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма и респираторно-синцитиальный вирус (RSV).

Другие заболевания и состояния включают различные воспалительные состояния. Примеры могут включать пролиферативный компонент. Конкретные примеры включают акне, стенокардию, артрит, аспирационную пневмонию, болезнь, эмпиему, гастроэнтерит, воспаление, кишечный грипп, некротизирующий энтероколит, колит, воспалительное заболевание органов малого таза, фарингит, плеврит, першение в горле, покраснение, покраснение, боль в горле, желудочный грипп и инфекции мочевыводящих путей, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, хроническую воспалительную демиелинизирующую

полирадикулонейропатию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию или хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулонейропатию.

В другом воплощении предлагается применение антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела, слитого белка, конъюгата или фармацевтической композиции, как описано выше, в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, хронического воспаления, аутоиммунного заболевания, инфекции или фиброза.

Изобретение находит применение в диагностике или лечении различных аутоиммунных заболеваний и воспалительных заболеваний. Воспалительное нарушение может быть острым или хроническим. Воспалительные нарушения включают воспалительные заболевания сердечно-сосудистой системы (например, атеросклероз, инсульт), воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта, воспалительные заболевания печени, воспаление легких (например, астму, вентилятор-индуцированное повреждение легких), воспаление почек, воспаление глаз (например, увеит), воспаление поджелудочной железы, воспалительные заболевания мочеполового тракта, нейровоспалительные нарушения (например, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера), аллергию (например, аллергический ринит/синусит, кожные аллергии и нарушения (например, крапивницу/уртикарную сыпь, ангионевротический отек, атопический дерматит, контактный дерматит, псориаз), пищевую аллергию, аллергию на лекарства, аллергию на насекомых, мастицитоз), воспаление, поражающее скелет (например, артрит, остеоартрит, ревматоидный артрит, спондилоартропатии), инфекцию (например, бактериальные или вирусные инфекции, воспалительные заболевания полости рта (например, пародонтит, гингивит или стоматит) и трансплантацию (например, отторжение аллотрансплантата или ксенотрансплантата) или несовместимость между матерью и плодом).

Аутоиммунные заболевания включают, например, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД, представляющий собой вирусное заболевание с аутоиммунным компонентом), очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание

внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТР), болезнь Бехчета, кардиомиопатию, спру-целиакию-герпетиформный дерматит, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD), рубцующийся пемфигиод, холодовую агглютининовую болезнь, CREST-синдром, болезнь Крона, болезнь Дега, ювенильный дерматомиозит, дискоидную волчанку, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, фибромиалгию, фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), IgA-нефропатию, инсулинозависимый сахарный диабет, ювенильный хронический артрит (болезнь Стилла), ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, миастению гравис, пернициозную анемию, узелковый полиартериит, полихондрит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию (прогрессирующий системный склероз (ПСС), также известный как системный склероз (СС)), синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, системную красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

Предпочтительно, аутоиммунное или воспалительное состояние представляет собой рассеянный склероз, ревматоидный артрит, гиперчувствительность кожи, такую как атопический дерматит, контактный дерматит, псориаз, воспалительное заболевание кишечника, увеит, сухость глаз, системный склероз (склеродермию), пародонтоз, витилиго, СКВ/дискоидную волчанку/болезнь Грейвса, атеросклероз, астму или гиперчувствительность замедленного типа.

Рассеянный склероз (РС) представляет собой воспалительное заболевание, сопровождающееся демиелинизацией миелиновых оболочек, окружающих аксоны головного и спинного мозга. Симптомы РС включают, без ограничения, рубцевание белого вещества головного и/или спинного мозга и широкий спектр неврологических симптомов, включая, помимо прочего, изменения чувствительности, такие как потерю чувствительности или пощипывание, покалывание или онемение (гипоэстезию и

парестезию), мышечную слабость, клонус, мышечные спазмы или трудности при движении; трудности с координацией и равновесием (атаксию); проблемы с речью (дизартрию) или глотанием (дисфагию), проблемы со зрением (нистагм, неврит зрительного нерва и так далее), утомляемость, острую/хроническую боль и проблемы с мочевым пузырем и кишечником. Также распространены когнитивные нарушения различной степени и депрессия. Симптомы РС обычно проявляются эпизодическими периодами обострения при постепенно прогрессирующем ухудшении неврологической функции или сочетанием того и другого.

Ревматоидный артрит представляет собой хроническое системное воспалительное заболевание, которое может поражать многие ткани и органы, но в основном поражает синовиальные соединения. Процесс включает воспалительный ответ синовиальной капсулы вокруг суставов, вторичную по отношению к гиперплазии синовиальных клеток, избыток синовиальной жидкости и развитие фиброзной ткани в синовиальной оболочке. Патология процесса заболевания нередко приводит к деструкции суставного хряща и анкилозу суставов. Ревматоидный артрит также может вызывать диффузное воспаление в легких, перикарде, легочной плевре, склере и узелковые поражения, чаще всего в подкожной клетчатке.

В данном документе фиброз включает любое одно или более из следующих состояний: легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз, муковисцидоз, цирроз, эндомикардиальный фиброз, перенесенный инфаркт миокарда, фиброз предсердия, фиброз средостения, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, нефрогенный системный фиброз, болезнь Крона, келоид, склеродермию/системный склероз, артрофиброз, болезнь Пейрони, контрактуру Дюпюитрена, некоторые формы адгезивного капсулита.

Пренеопластические и неопластические заболевания являются конкретными примерами, к которым могут быть применены способы по изобретению. Обширные примеры включают опухоли молочной железы, колоректальные опухоли, аденокарциномы, мезотелиому, опухоли мочевого пузыря, опухоли предстательной железы, герминогенные опухоли, гепатому/холангиокарциному, нейроэндокринные опухоли, новообразования гипофиза, мелкокруглоклеточные опухоли, плоскоклеточный рак, меланому, атипичную фибросантому, семиномы, несеминомы, стромальные опухоли из клеток Лейдига, опухоли из клеток Сертоли, опухоли кожи, опухоли почек, опухоли яичек, опухоли головного мозга, опухоли яичников, опухоли



желудка, опухоли полости рта, опухоли мочевого пузыря, опухоли костей, опухоли шейки матки, опухоли пищевода, опухоли гортани, опухоли печени, опухоли легких, опухоли влагалища и опухоль Вильмса.

Примеры конкретных видов рака включают, без ограничения, аденокарциному, аденому, аденофибром, аденолимфому, адонтому, связанные со СПИДом злокачественные заболевания, акустическую неврому, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокистозную карциному, адренокортикальный рак, агногенную миелоидную метаплазию, алопецию, альвеолярную мягкотканную саркому, амелобластому, ангиокератому, ангиолимфоидную гиперплазию с эозинофилией, склерозирующую ангиому, ангиоматоз, апудому, рак анального канала, ангиосаркому, апластическую анемию, астроцитому, атаксию-телеангиэктазию, базальноклеточную карциному (кожи), рак мочевого пузыря, злокачественные заболевания костной ткани, рак кишечника, глиому ствола головного мозга, опухоли головного мозга и ЦНС, рак молочной железы, бранхиому, опухоли ЦНС, карциноидные опухоли, рак шейки матки, детские опухоли головного мозга, рак у детей, лейкоз у детей, саркому мягких тканей у детей, хондросаркому, хориокарциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, карциному (например, Уокера, базальноклеточную, базосквамозную, Браун-Пирса, протоковую, опухоль Эрлиха, Кребс-2, из клеток Меркеля, муцинозную, немелкоклеточный рак легкого, овсяноклеточную, папиллярную, скirroзную, бронхиолярную, бронхогенную, плоскоклеточную и переходно-клеточную), карциносаркому, дисплазию шейки матки, филоидную цистосаркому, цементому, хордому, хористому, хондросаркому, хондробластому, краниофарингиому, холангиому, холестеатому, цилиндrome, цистаденокарциному, цистаденому, взрывающую дерматофибросаркому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, протоковую карциному, дисгерминому, эндокринный рак, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, рак внепеченочных желчных протоков, злокачественные заболевания глаз: меланому, ретинобластому, рак фаллопиевых труб, анемию Фанкони, фибром, фибросаркому, рак желчного пузыря, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, карциноид желудочно-кишечного тракта, рак органов мочеполовой системы, герминогенные опухоли, гестационную трофобластическую болезнь, глиому, рак женских половых органов, гигантоклеточные опухоли, ганглионеврому, глиому,

гломангиому, гранулезоклеточную опухоль, гинандробластому, злокачественные заболевания кроветворной ткани, волосатоклеточный лейкоз, злокачественные заболевания головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, наследственный рак молочной железы, гистиоцитоз, болезнь Ходжкина, вирус папилломы человека, пузырьный занос, гиперкальциемию, рак гортаноглотки, гамартому, гемангиоэндотелиому, гемангиому, гемангиоперицитому, гемангиосаркому, гемангиосаркому, гистиоцитарные нарушения, злокачественный гистиоцитоз, гистиоцитому, гепатому, гидраденому, хондросаркому, иммунопролиферативную болезнь тонкого кишечника, опому, интраокулярную меланому, опухоль из островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, рак гортани, лейомиосаркому, лейкоз, синдром Ли-Фраумени, рак губы, липосаркому, рак печени, рак легкого, лимфедему, лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейомиосаркому, лейкоз (например, В-клеточный, смешанный, нуль-клеточный, Т-клеточный, Т-клеточный хронический, лимфангиосаркому, острый лимфоцитарный, хронический лимфоцитарный, тучноклеточный и миелоидный), лейкосаркому, опухоль из клеток Лейдига, липосаркому, лейомиому, лейомиосаркому, лимфангиому, лимфангиоцитому, лимфагиому, лимфагиомиому, лимфангиосаркому, рак молочной железы у мужчин, злокачественную рабдоидную опухоль почки, медуллобластому, меланому, рак из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический рак, рак ротовой полости, множественную эндокринную неоплазию, грибовидную гранулему, миелодиспластические синдромы, миелому, миелолиферативные нарушения, злокачественный карциноидный синдром, карциноидную болезнь сердца, медуллобластому, менингиому, меланому, мезенхимому, мезонефрому, мезотелиому, миобластому, миому, миосаркому, миксому, миксосаркому, рак носа, рак носоглотки, нефробластому, нейробластому, нейрофиброматоз, синдром Неймегена, немеланомные новообразования кожи, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), неврилеммому, нейробластому, нейроэпителиому, нейрофиброматоз, нейрофиброму, неврому, новообразования (например, костей, молочной железы, пищеварительной системы, ободочной и прямой кишки, печени), злокачественные заболевания глаз, рак пищевода, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичников с наложением стомы, рак поджелудочной железы, рак околоносовых пазух, рак парашитовидной железы, рак околоушной железы, рак полового члена, периферические нейроэктодермальные опухоли, злокачественные заболевания гипофиза, истинная полицитемия, рак

предстательной железы, остеому, остеосаркому, рак яичников, папиллому, параганглиому, нехромоаффинную параганглиому, пинеалому, плазмоцитому, протоонкоген, редкие онкологические заболевания и ассоциированные заболевания, почечно-клеточную карциному, ретинобластому, рабдомиосаркому, синдром Ротмунда-Томсона, ретикулоэндотелиоз, рабдомиому, рак слюнных желез, саркому, шванному, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, опухоли спинного мозга, плоскоклеточный рак (кожи), рак желудка, синовиальную саркому, саркому (например, Юинга, экспериментальную, Капоши и тучноклеточную саркомы), опухоль из клеток Сертоли, синовиому, рак яичка, рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак (мочевого пузыря), переходно-клеточный-рак (почечной лоханки/мочеточника), трофобластический рак, тератому, тека-клеточную опухоль, тимому, трофобластическую опухоль, рак уретры, рак мочевыделительной системы, уроплакины, саркому матки, рак матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

В изобретении предложен способ предупреждения псориаза у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму с риском развития псориаза, дают антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, как описано в данном документе. Предпочтительно, псориаз представляет бляшковидный псориаз. Предупреждение псориаза можно измерить по отсутствию эритемы, шелушения или утолщения кожи.

В изобретении предложен способ лечения псориаза или артрита у индивидуума, включающий стадию, на которой индивидууму, нуждающегося в лечении псориаза, дают антигенсвязывающий белок, переменный домен иммуноглобулина, антитело, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагмент, диатело, триатело, линейное антитело, молекулу одноцепочечного антитела или мультиспецифическое антитело, слитый белок, конъюгат или фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе. Предпочтительно, псориаз представляет собой бляшковидный псориаз.

Лечение псориаза можно определять по любому клинически или биохимически наблюдаемому или измеряемому признаку. Предпочтительно, лечение псориаза определяют по уменьшению эритемы, шелушения или утолщения кожи.

Успешное лечение артрита можно определить по любому клинически или биохимически наблюдаемому или измеряемому признаку. Например, лечение ревматоидного артрита можно оценивать, наблюдая улучшение у субъекта в отношении тяжести и продолжительности симптома, связанного с ревматоидным артритом. Например, выявление улучшения включает использование балла, теста или показателя РА или воспаления, включая определение того, имеется ли у субъекта улучшение баллов по одному или более показателям ревматоидного артрита. Балл, тест или показатель могут быть выбраны из группы, состоящей из одного или более критериев ответа, предложенных Американской коллегией ревматологов (ACR, например, ACR20, ACR50 и ACR70); доли субъектов, достигших низкой активности заболевания (LDA); показателя активности заболевания 28 (DAS28; например, на основе С-реактивного белка); припухших суставов; болезненных суставов; оценки боли пациентом; общей активности заболевания и физической функции; общей оценки врачом активности заболевания и уровней маркеров острой фазы; и доли субъектов с объективным ответом ACR70. Кроме того, показатель ревматоидного артрита предпочтительно выбран из группы, состоящей из: общей оценки врачом активности заболевания; результата лечения по оценке пациента; опросника оценки состояния здоровья (HAQ-DI); общей оценки пациентом активности заболевания (VAS)); измерение или наличие антитела к лекарственному средству (ADA); числа болезненных суставов (TJC); числа припухших суставов (SJC); оценки боли пациентом; оценки риска нетрудоспособности при ревматоидном артрите по шкале «Work Instability»; Краткого опросника из 36 пунктов о состоянии здоровья (SF-36); Американской коллегии ревматологов, ACR (например, ACR20, ACR50 и ACR70); доли субъектов, достигших низкой активности заболевания (LDA); показателя активности заболевания 28 (DAS28; например, DAS28 на основе С-реактивного белка); индекса клинической активности заболевания (CDAI); простого индекса активности заболевания (SDAI) и критериев клинической ремиссии. Специалисту в данной области знакомы стандартные способы оценки баллов для показателя ревматоидного артрита.

В одном воплощении способ по настоящему изобретению снижает показатель РА по меньшей мере приблизительно на 1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% и более.

Специалисту в данной области также известно, было ли лечение остеоартрита успешным. Например, лечение можно оценить, наблюдая за улучшением одного или

нескольких показателей, выбранных из группы, состоящей из индекса артрита, разработанного в университете Западного Онтарио и университете Макмастер (WOMAC), оценки магниторезонансных изображений всего органа (шкала WORMS), оценки периодической и постоянной боли при остеоартрите (ICOAP); 11-балльной цифровой рейтинговой шкалы (NRS), общей оценки активности заболевания врачом, результата лечения по оценке пациента, опросника для оценки состояния здоровья (HAQ-DI), интенсивности боли с использованием общей оценки активности заболевания пациентом (VAS)), измерения или наличия антител к лекарственному средству (ADA), подсчета болезненных суставов (TJC), подсчета припухших суставов (SJC), оценки боли пациентом, шкалы нестабильности работы при ревматоидном артрите, Краткого опросника из 36 пунктов о состоянии здоровья (SF-36), показателя ACR, предложенного Американской коллегией ревматологов (например, ACR20, ACR50 и ACR70); доли субъектов, достигших низкой активности заболевания (LDA); Шкалы активности заболевания 28 (DAS28; например, DAS28 на основе С-реактивного белка), индекса клинической активности заболевания (CDAI), простого индекса активности заболевания (SDAI), критерия клинической ремиссии и оценки индивидуумом (например, опросника или общей оценки пациентом) наблюдающихся у субъекта, получающего лечение по данному изобретению.

Кроме того, лечение остеоартрита можно оценивать по уменьшению у индивидуума боли, связанной с остеоартритом (например, остеоартритом коленного сустава от умеренной до тяжелой степени и/или эрозивным остеоартритом кисти от умеренной до тяжелой степени). Болевое состояние может быть выбрано из группы, состоящей из аллодинии, гипералгезии и комбинации аллодинии и гипералгезии. Кроме того, лечение можно оценивать путем определения синовита коленного сустава /объема выпота, поражений костного мозга коленного сустава и распространенности остеоартрита по данным магнитно-резонансной томографии.

Псориатический артрит (ПсА) относится к хроническому воспалительному артриту, связанному с псориазом, распространенным хроническим заболеванием кожи, которое вызывает появление красных пятен на теле. Примерно у 1 из 20 человек с псориазом наряду с кожными заболеваниями развивается артрит, и примерно в 75% случаев артрит предшествует псориазу. ПсА проявляется по-разному, от легкого до тяжелого артрита, при этом артрит обычно поражает пальцы и позвоночник. ПсА иногда ассоциируется с мутилирующим артритом. Мутилирующий артрит относится к

заболеванию, которое характеризуется чрезмерной эрозией кости, приводящей к грубой эрозивной деформации, которая калечит сустав.

При поражении позвоночника симптомы ПсА сходны с симптомами анкилозирующего спондилита. Анкилозирующий спондилит (АС) представляет собой воспалительное заболевание, включающее воспаление одного или более позвонков. АС представляет собой хроническое воспалительное заболевание, поражающее осевой скелет и/или периферические суставы, включая суставы между позвонками позвоночника и крестцово-подвздошными суставами, а также суставы между позвоночником и тазом. АС может в конечном итоге привести к слиянию или срастанию пораженных позвонков. Спондилоартропатии, включая АС, могут быть связаны с псориатическим артритом (ПсА) и/или воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК), включая язвенный колит и болезнь Крона.

Ранние проявления АС можно определить с помощью рентгенологических исследований, включая КТ и МРТ. Ранние проявления АС часто включают сакроилеит и изменения в крестцово-подвздошных суставах, о чем свидетельствует нечеткость кортикальных краев субхондральной кости с последующим появлением эрозий и склероза. Усталость также была отмечена как общий симптом АС.

Характерные рентгенологические признаки ПсА включают эрозии суставов, сужение суставной щели, костную пролиферацию, включая периартикулярный и диафизарный периостит, остеолит, включая деформацию «карандаш в стакане» и акроостеолит, анкилоз, образование шпор и спондилит (Wassenberg et al. (Wassenberg et al.). 2001) Z Ревматол 60:156). В отличие от ревматоидного артрита (РА), поражение суставов при ПсА часто бывает асимметричным и может быть олигоартикулярным; остеопороз нетипичен. Хотя эрозивные изменения при раннем ПсА пограничны, как и при РА, они становятся нерегулярными и нечеткими по мере прогрессирования заболевания из-за образования периостальной костной ткани рядом с эрозиями. В тяжелых случаях эрозивные изменения могут прогрессировать до развития деформации «карандаш в стакане» или выраженного остеолита (Gold et al. (Gold et al.) 1988) Radiol Clin North Am 26:1195; Резник и др. (1977)) J Can Assoc Radiol 28:187). Асимметричные эрозии могут быть видны рентгенологически в области запястья и пястно-фаланговых (ПФ), проксимальных межфаланговых (ПМФ) и дистальных межфаланговых (ДМФ) суставах кистей, но ДМФ-суставы часто поражаются первыми. Аномалии видны в фаланговых пучках и в местах прикрепления сухожилий и связок к кости. Наличие

эрозивных изменений ДМФ может служить как чувствительными, так и специфическими рентгенологическими признаками, подтверждающими диагноз ПсА. Кроме того, кисти рук, как правило, поражаются гораздо чаще, чем стопы, с соотношением почти 2:1.

Таким образом, успешное лечение ПсА включает улучшение или исчезновение любого одного или более симптомов, связанных с ПсА (включая улучшение симптомов или показателей, связанных с артритом, псориазом и анкилозирующим спондилитом).

Величина дозировки, частота дозирования, пути введения и так далее подробно описаны выше.

В другом воплощении предложен способ диагностики рака или воспалительного заболевания, включающий стадию приведения в контакт тканей или клеток, для которых необходимо определить наличие или отсутствие злокачественного или воспалительного заболевания, с реагентом в форме антигенсвязывающего белка, переменного домена иммуноглобулина, антитела, *dab*, *scFv*, *Fab*, *Fab'*, *F(ab')<sub>2</sub>*, *Fv* фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела, слитого белка, конъюгата или диагностической композиции, как описано выше, и определения связывания реагента с тканями или клетками. Способ может осуществляться *in vivo* или *in vitro*.

Для диагностики *in situ* антигенсвязывающий белок можно вводить в организм, подлежащий диагностированию, путем внутривенной, интраназальной, внутривентрикулярной, внутримозговой, внутриартериальной инъекции или другими путями, так чтобы могло произойти специфическое связывание антигенсвязывающего белка по изобретению с областью эпитопа на CCR6. Комплекс антитело/антиген можно легко детектировать с помощью метки, прикрепленной к антигенсвязывающему белку или его функциональному фрагменту, или с помощью любого другого способа детекции, известного в области техники.

Иммуноанализы, используемые в диагностических целях согласно изобретению и описанные в данном документе, обычно основаны на меченых антигенах, антителах или вторичных реагентах для детекции. Эти белки или реагенты могут быть помечены соединениями, общеизвестными специалистам в области техники, включая ферменты, радиоизотопы и флуоресцентные, люминесцентные и хромогенные вещества, включая, без ограничения, окрашенные частицы, такие как коллоидное золото и латексные шарики. Из них радиоактивное мечение может использоваться почти для всех типов

анализов и с большинством вариаций. Метки, конъюгированные с ферментами, особенно полезны, когда необходимо избегать радиоактивности или когда необходимы быстрые результаты. Флуорохромы, хотя и требуют для своего использования дорогостоящего оборудования, обеспечивают очень чувствительный способ обнаружения. Антитела, применимые в этих анализах, включают моноклональные антитела, поликлональные антитела и аффинно очищенные поликлональные антитела.

В качестве альтернативы, антигенсвязывающий белок может быть помечен не напрямую, путем реакции с мечеными веществами, обладающими сродством к иммуноглобулину, такими как белок А или G или вторые антитела. Антигенсвязывающий белок может быть конъюгирован со вторым веществом и обнаружен с помощью меченого третьего вещества, обладающего сродством ко второму веществу, конъюгированному с антигенсвязывающим белком. Например, антигенсвязывающий белок может быть конъюгирован с биотином, а конъюгат антигенсвязывающий белок-биотин можно детектировать с использованием меченого авидина или стрептавидина. Аналогично, антигенсвязывающий белок может быть конъюгирован с гаптенем, а конъюгат антигенсвязывающий белок-гаптен можно детектировать с использованием меченого антитела против гаптена.

В некоторых воплощениях в иммуноанализах используют метод двойного антитела для обнаружения присутствия аналита, при этом антигенсвязывающий белок метят не напрямую благодаря способности реагировать со вторым антителом, которое было помечено детектируемой меткой. Второе антитело предпочтительно представляет собой антитело, которое связывается с антителами животного, из которого получен антигенсвязывающий белок. Другими словами, если антигенсвязывающий белок представляет собой мышинное антитело, то меченое второе антитело является антимышиным антителом. Для антигенсвязывающего белка, используемого в описанном здесь анализе, эта метка предпочтительно представляет собой гранулу, покрытую антителом, в частности, магнитную гранулу. Для антигенсвязывающего белка, используемого в описанном здесь иммунологическом анализе, метка предпочтительно представляет собой детектируемую молекулу, такую как радиоактивное, флуоресцентное или электрохемилюминесцентное вещество.

Альтернативная система двойных антител, часто называемая системами быстрого формата, поскольку они адаптированы для быстрого определения присутствия аналита, также может быть использована в рамках данного изобретения.



Система требует высокой аффинности между антигенсвязывающим белком и аналитом. Согласно одному воплощению данного изобретения присутствие CCR6 определяют с использованием пары антигенсвязывающих белков, каждый из которых специфичен в отношении белка CCR6. Один антигенсвязывающий белок из указанной пары упоминается здесь как «детекторный антигенсвязывающий белок», а другой антигенсвязывающий белок из указанной пары упоминается здесь как «захватывающий антигенсвязывающий белок». Антигенсвязывающий белок по данному изобретению можно применять либо в качестве захватывающего антигенсвязывающего белка, либо в качестве детекторного антигенсвязывающего белка. Антигенсвязывающий белок по данному изобретению также можно применять в качестве и захватывающего, и детекторного антигенсвязывающего белка вместе в одном анализе. Таким образом, в одном воплощении данного изобретения используется метод двойного сэндвича с антигенсвязывающим белком для детекции CCR6 в образце биологической жидкости. В этом способе аналит (белок CCR6) помещается между детекторным антигенсвязывающим белком и захватывающим антигенсвязывающим белком, при этом захватывающий антигенсвязывающий белок необратимо иммобилизуют на твердом носителе. Детекторный антигенсвязывающий белок должен содержать детектируемую метку для обнаружения присутствия сэндвича антигенсвязывающего белка с аналитом и, таким образом, присутствия аналита.

Примеры твердофазных веществ включают, без ограничения, планшеты для микротитрования, пробирки из полистирола, магнитные, пластиковые или стеклянные гранулы и предметные стекла, которые хорошо известны в области радиоиммуноанализа и иммуноферментного анализа. Способы для связывания антигенсвязывающих белков с твердыми фазами также хорошо известно специалистам в данной области техники. Совсем недавно в качестве твердых носителей стали использовать ряд пористых материалов, таких как нейлон, нитроцеллюлоза, ацетат целлюлозы, стекловолокно и другие пористые полимеры.

Следует понимать, что изобретение, изложенное и охарактеризованное в данном описании, распространяется на все альтернативные комбинации двух или более отдельных признаков, упомянутых или очевидных, исходя из текста или графических материалов. Все эти различные комбинации составляют различные альтернативные аспекты изобретения.

Приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, но никоим

образом не ограничивают данное изобретение.

## **ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **Пример 1 - Получение моноклонального антитела к человеческому CCR6**

Моноклональные антитела, реагирующие с человеческим CCR6 (hCCR6), получали путем иммунизации мышей C57BL/6 по  $2 \times 10^7$  трансфицированных клеток L1.2/hCCR6, стимулированных за 20 ч до сбора 5 мМ бутировой кислотой и эмульгированных в полном адъюванте Фрейнда (1-я иммунизация внутривентриально) или неполном адъюванте Фрейнда (со 2-й по 6-ю иммунизации внутривентриально) суммарно пять-шесть раз с 2-недельными интервалами. Последнюю иммунизацию осуществляли путем внутривенной инъекции в PBS. Через четыре дня забирали селезенку и сливали клетки с линией клеток SP2/0 с применением стандартных способов. Гибридомы культивировали в DMEM (Gibco/Invitrogen), содержащей 10% Fetalclone (HyClone), 1х добавку гипоксантин-аминоптерин-тимидин (HAT) (Sigma Aldrich) плюс мышьяный IL-6. Через 10-14 дней роста культуральную надосадочную жидкость собирали для первоначального скрининга.

Моноклональные антитела, реагирующие с CCR6, обнаруживали с применением клеток L1.2, трансфицированных человеческим CCR6, и нетрансфицированных клеток L1.2 или клеток L1.2, трансфицированных неродственными или близкородственными рецепторами, такими как hCXCR1, hCXCR2 или hCXCR3 с применением иммунофлуоресцентного окрашивания и анализа с применением FACSCalibur (BD Biosciences). Окрашивание клеток моноклональными антителами осуществляли при помощи стандартных процедур, как описано ранее (Lee et al., 2006, Nat. Biotech. 24:1279-1284).

Получение антител включало культивирование гибридом во флаконах для культуры тканей и сбор культуральной среды. В некоторых экспериментах концентрация антитела в культуральной надосадочной жидкости была достаточной для продолжения работы без дальнейшей очистки. Производство отобранных антител масштабировали и очищали моноклональные антитела при помощи хроматографии с белком G, концентрировали и осуществляли замену буфера на PBS. Концентрацию моноклональных антител определяли посредством ELISA на общий IgG.

Трансфектанты L1.2, экспрессирующие высокие уровни hCCR6, использовали для иммунизации мышей и первоначально обнаруживали при помощи проточной цитометрии около 40 моноклональных антител, реагировавших с клетками L1.2,

трансфицированными hCCR6, из которых приблизительно 10 специфически реагировали с трансфектантами L1.2/hCCR6, но не с нетрансфицированными клетками L1.2 или клетками L1.2, трансфицированными близкородственными рецепторами hCXCR1, hCXCR2 или hCXCR3 (Фиг. 3).

Для обеспечения клональности отобранные гибридомы субклонировали, осуществляя посев с разведением в 384-луночные планшеты (показано в Таблице 7 ниже). Специфичность перекрестной реактивности субклонов подтверждали при помощи проточной цитометрии с трансфектантами L1.2/hCCR6 и нетрансфицированными клетками L1.2.

Гибридома	№ клонов, положительных по hCCR6 (трансфектантов)	№ отобранных клонов	Изотип
AB1	6/28	AB1-O17	IgG1
AB3	6/11	AB3-N21	IgG1
AB8	4/30	**	
AB9	9/9	AB9-K16	IgG1
AB2	6/16	AB2-O17	IgG1
AB5	4/20	AB5-M19	IgG1
AB10	5/16	AB10-N16	IgG1
AB11	21/21	AB11-M9	IgG1
AB6	14/23	AB6-K5	IgG2b
AB4	2/21	AB4-K15	IgG2b
AB12	2/15	**	

\*\* все субклоны отрицательны на человеческих лимфоцитах

**Пример 2** - Секвенирование генов вариабельной области антитела к человеческому CCR6

Общую РНК из анти-CCR6 гибридом использовали для синтеза кДНК для анализа посредством секвенирования. Гены вариабельных областей амплифицировали посредством RT-PCR с использованием праймеров, отжигающихся с константными областями мышиной легкой (mIgCk) и тяжелой (mIgG2a) цепей и секвенировали гены вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL).

**Пример 3** - Конкуренентное ингибирование связывания лиганда моноклональными антителами к CCR6

Для анализа связывания лигандов получали рекомбинантный человеческий CCL20 (MIP3 $\alpha$ ) («лиганд») из Peprotech (New Jersey, USA). MIP3 $\alpha$ , меченый йодом-125 с применением реактива Болтона-Хантера, приобретали в Perkin-Elmer (Boston, MA, USA), со специфической активностью 2200 Ки/мМ. Клетки однократно промывали буфером для связывания (50 мм HEPES, pH 7,5, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5% BSA) и ресуспендировали в буфере для связывания до концентрации  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл. Не содержащее радиоактивной метки очищенное моноклональное антитело или разведенную культуральную среду гибридом (не содержащий радиоактивной метки конкурент) добавляли в 96-луночный планшет с последующим добавлением равного объема (40 мкл) буфера для связывания, содержащего  $1 \times 10^5$  клеток. Клетки и конкурент предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем в каждую лунку добавляли радиоактивно меченый лиганд (конечная концентрация 0,5 - 2 нМ) с получением конечного объема реакционной смеси 120 мкл. Через 60 мин инкубации при комнатной температуре клетки три раза промывали 1 мл буфера для связывания, содержащего 150 мМ NaCl. Радиоактивность (количество связанной метки) в клеточном осадке подсчитывали при помощи сцинтилляционного счетчика для жидкости TopCount (Packard). Фоновое неспецифическое связывание подсчитывали путем инкубации клеток без радиоактивно меченного лиганда. Образцы анализировали в двух повторностях.

Первоначально проводили скрининг панели моноклональных антител к CCR6, у которых было обнаружено связывание с трансфектантами CCCR6 человека, на их способность конкурентно ингибировать связывание меченого <sup>125</sup>I лиганда с трансфектантами hCCR6/L1.2, обработанными 5 мМ бутировой кислоты в течение 20 ч перед анализом. После инкубации и промывания измеряли количество метки, связанной с клетками, и определяли процент ингибирования путем сравнения с контрольной реакцией без добавления антитела (Фиг. 1 и 5).

**Пример 4** - Анализ хемотаксиса трансфектантов

Клетки L1.2, трансфицированные человеческим CCR6, осаждали путем центрифугирования и промывали средой для миграции (MM=RPMI 1640, 0,5% BSA) и ресуспендировали до  $10^7$  клеток/мл. В каждую лунку 24-луночных планшетов для культуры тканей помещали вставки для культуры ткани (Becton Dickinson & Co.,

Mountain View, Calif.), образующие верхнюю и нижнюю камеры, разделенные мембраной из полиэтилентерефталата, имеющей поры диаметром 3 мм. В 24-луночные планшеты для культуры ткани добавляли MIP3 $\alpha$ , вызывающий хемотаксис, (разведенный в среде для анализа) в 600 мкл среды для анализа. Один миллион клеток в 100 мкл предварительно инкубировали в течение 30 мин с антителами. В верхнюю камеру лунок добавляли очищенные mAb и давали клеткам мигрировать в нижнюю камеру в течение 18 ч в инкубаторе, поддерживающем 5% CO<sub>2</sub>, 37° С. После миграции клеток вставки вынимали и подсчитывали клетки при помощи цитометра LSRII (BD Biosciences). Относительное количество клеток получали путем регистрации событий в течение установленного периода времени 30 секунд. Данный способ оказался хорошо воспроизводимым и позволял гейтировать живые клетки и исключать дебрис (Фиг. 2, 6 и 7).

#### **Пример 5 - Картирование эпитопов**

Исследования по картированию эпитопов проводили для определения области CCR6, распознающей mAb к CCR6. Первоначально в ELISA использовали биотинилированные пептиды, соответствующие N-концевой области и первой, второй и третьей внеклеточным петлям человеческого CCR6. Результаты этого предварительного исследования по картированию указывали, что все анти-CCR6 mAb распознавали N-концевую область CCR6.

Затем синтезировали два перекрывающихся биотинилированных пептида, охватывающих всю N-концевую область человеческого CCR6 и использовали в более подробных исследованиях по картированию эпитопов mAb к CCR6. Пептид 1 (MSGESMNFSDVFDSSSEDYFASVNTSYYT, SEQ ID NO: 2), соответствует аминокислотным положениям 1-28 человеческого CCR6, а пептид 2 (YFASVNTSYYTVDSEMLLCTLHEVRQFSR, SEQ ID NO: 101) соответствует аминокислотным положениям 18-46 человеческого CCR6. Вкратце, многолуночные планшеты покрывали стрептавидином и промывали перед добавлением биотинилированных пептидов в отдельные лунки и инкубировали, чтобы способствовать связыванию пептидов с планшетом. Затем тестировали различные антитела к человеческому CCR6 путем добавления соответствующих антител в лунки планшета и инкубации планшета. В качестве отрицательных контролей включали изотипический контроль и только буфер. После промывания добавляли соответствующие конъюгированные антитела и инкубировали планшеты. Планшеты

вновь промывали и визуализировали связывание антител с иммобилизованными пептидами (Фиг. 8 и 9).

Результаты: Большинство антител к hCCR6 распознавало N-концевую область человеческого CCR6. Более конкретно, большинство антител реагировало с областью, включающей первые 28 АК. Только клон АВ7 распознавал эпитоп, включающий АК с 18 по 46.

#### **Пример 6** - Получение гуманизированного mAb АВ6

Гуманизированные mAb АВ6 создавали путем переноса CDR от mAb АВ6 (CDR-H1; CDR-H2; CDR-H3; CDR-L1; CDR-L2 и CDR-L3) на каркасные области человеческого происхождения с применением стандартных методов молекулярной биологии (Фиг. 10 и 11). Для идентификации генов в конфигурации зародышевой линии человека, у которых последовательности варьируемых областей как тяжелой, так и легкой цепей хорошо выравнивались с таковыми мышинового антитела, использовали инструменты анализа IMGT/V-QUEST и IMGT/Junctions. Каркасные последовательности этих отобранных генов в конфигурации зародышевой линии человека использовали в качестве акцепторных последовательностей для CDR мышинового АВ6 (человеческие гены IGHV3-48\*02 и IGKV2-28\*01 согласно базе данных IMGT). Кроме того, сохраняли мышинные остатки в критической зоне Вернье. Гуманизированные гены VH и VL, которые были также оптимизированы по составу кодонов для экспрессии в клетках CHO, синтезировали в Genescript.

Варианты Fc гуманизированного антитела АВ6 создавали при помощи методов стандартного сайт-специфического мутагенеза для усиления или уменьшения антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Для усиления ADCC в Fc вводили тройную мутацию S239D/A330L/I332E (система нумерации Eu), известную как "3M", с получением гуманизированного антитела АВ6-3MFc. Для уменьшения ADCC в Fc также вводили тройную мутацию L234F/L235E/P331S (система нумерации Eu) с получением гуманизированного антитела АВ6-Fc-KO (3SFC).

**Пример 7** - Анализ антитело-зависимой клеточной цитотоксичности ADCC при помощи проточной цитометрии

Способность hAB6 (3MFc и 3SFC) индуцировать опосредованный эффекторными клетками лизис клеток L1.2, трансфицированных hCCR6, оценивали при помощи проточной цитометрии. Вкратце, клетки L1.2, трансфицированные hCCR6, метили мембранным красителем PKH26, чтобы отличать их при инкубации с

эффektorными клетками и антителами. Меченые клетки-мишени промывали 3 раза культуральной средой и ресуспендировали в культуральной среде в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл. Меченые клетки-мишени вносили в круглодонные 96-луночные планшеты ( $1 \times 10^5$  в 100 мкл/лунку) и предварительно инкубировали с 20 мкг/мл hAB6 или изотипического контроля человеческого IgG1 (Sigma) при 37°C в течение 30 минут. Из гепаринизированной крови (полученной у здоровых индивидуумов) выделяли РВМС посредством центрифугирования в Ficoll. Затем РВМС (эффektorные клетки) добавляли в 96-луночные планшеты, содержащие клетки-мишени, при соотношении эффektorные клетки:клетки-мишени (Е:Т) 1:50 и инкубировали при 37°C в течение 3 часов. Непосредственно перед анализом на цитометре LSRII (BD Biosciences) добавляли TO-PRO 3 иодид для детектирования клеточной гибели.

Результаты: Эффektorные функции гуманизированного антитела к hCCR6 могут быть модифицированы для истощения (3MFc) или блокирования (3SFc) клеток, положительных по CCR6 человека (Фиг. 12 и 16).

#### **Пример 8 - Получение мышей, трансгенных по гуманизированному hCCR6**

Трансгенных по человеческому CCR6 мышей получали с применением клона RP11-319P19 искусственной бактериальной хромосомы (BAC), содержащего ген человеческого CCR6. Линеаризацию BAC осуществляли при помощи рестрикционной эндонуклеазы. Фрагмент гена человеческого CCR6 очищали и инжектировали однодневным эмбрионам C57BL/6 посредством пронуклеарной микроинъекции. Затем эмбрионы имплантировали суррогатным самкам ICR и осуществляли скрининг на наличие трансгенов с человеческим CCR6 среди полученного потомства при помощи ПЦР. Мышей hCCR6+ скрещивали с мышами mCCR6-/- с получением линий hCCR6+/mCCR6-/- (Фиг. 13).

Результаты: Для исследования человеческого CCR6 с точки зрения противовоспалительной активности антитела к человеческому CCR6 авторы изобретения экспрессировали hCCR6—под контролем его эндогенного промотора для воспроизведения характерного *in vivo* паттерна экспрессии hCCR6— у мыши. Клоны искусственной бактериальной хромосомы (BAC), кодирующие человеческий ген hCCR6 и его регуляторные области, внедряли в качестве трансгена мышам. У трансгенных мышей наблюдалась поверхностная экспрессия этого рецептора хемокинов человека на лимфоцитах в периферической крови и селезенке, напоминающая паттерн экспрессии CCR6 у человека (Фиг. 14).

**Пример 9** - Влияние гуманизированного mAb AB6 *in vivo* на экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ)

Несколько исследований продемонстрировали, что CCR6, рецептор, преимущественно экспрессируемый клетками CD4<sup>+</sup> Th17, а также его соответствующий лиганд (CCL20, MIP-3 $\alpha$ ), задействованы в рассеянном склерозе. Соответственно, проводили эксперименты, чтобы установить, будет ли блокирование CCR6<sup>+</sup> клеток с использованием гуманизированного mAb AB6 на модели ЭАЭ у мышей приводить к иммуносупрессии и улучшению исходов заболевания.

Для индукции ЭАЭ самкам мышей hCCR6 Tg C57BL/6 в возрасте от 8 до 12 недель осуществляли подкожную инъекцию 100 мкг рекомбинантного мышинового MOG 1-117 (Clements CSet al. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 11059–11064) в полном адьюванте Фрейнда (DIFCO Laboratories, Detroit, MI). После иммунизации и 48 часов спустя мыши получали внутривенную инъекцию 200 нг коклюшного токсина. Отдельных животных осматривали ежедневно и осуществляли клиническую оценку следующим образом: 0 = отсутствие клинических проявлений заболевания, 1 = изолированная потеря тонуса хвоста, 2 = умеренный монопарез или парапарез, 3 = тяжелый парапарез, 4 = параплегия и/или тетрапарез и 5 = агония или летальный исход. Время введения антител предшествует клиническому проявлению начала заболевания и таким образом дает возможность проверить, способны ли антитела к CCR6 задерживать развитие или уменьшать тяжесть заболевания.

Однократную инъекцию PBS, очищенного гуманизированного mAb к CCR6 или изотипического контроля (5 мг/кг) осуществляли на 8 день после иммунизации.

Результаты: Воздействие на трансгенных по hCCR6 мышей однократной инъекции гуманизированного антитела к hCCR6 (hAB6-3SFC) существенно уменьшало развитие ЭАЭ (Фиг. 15).

**Пример 10** - Гистологический анализ животных из исследования ЭАЭ, описанного в Примере 9 выше.

Репрезентативное окрашивание гистологических срезов спинного мозга иммунизированных животных, получавших изотипический контроль или mAb к ccr6 (исследование по предупреждению). Серию срезов окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для определения степени воспалительной клеточной инфильтрации, люксолом прочным синим (LFB: клинья) для установления целостности миелина и выполняли импрегнацию серебром по Бильшовскому для подтверждения потери и



повреждения аксонов (стрелки) (см. Фиг. 17). Введение антитела hAB6 приводило к блокированию инфильтрации воспалительными клетками, такими как Т клетки, В клетки и макрофаги. Антитело также уменьшало разрушение миелина и предотвращало утрату и повреждение аксонов.

**Пример 11** - Влияние гуманизованного mAb AB6 *in vivo* на экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ)

Самкам мышей hCCR6 Tg в возрасте от 8 до 12 недель осуществляли подкожные инъекции 100 мкг gMOG 1-117 в полном адьюванте Фрейнда. После иммунизации и 48 часов спустя мыши получали внутривенную инъекцию 200 нг коклюшного токсина. При достижении средней клинической оценки 2 (День 15) животные получали 2 мг/кг гуманизованного антитела к hCCR6 или гуманизованного mAb к hCXCR3 (группа изотипического контроля). Животные получали вторую инъекцию на 19 день. Результаты показаны на Фиг. 18.

Результаты: Введение гуманизованного mAb AB6 на 15 день приводило к стабилизации клинического заболевания, а последующее введение на 19 день приводило к заметному улучшению монопареза или парепареза, что позволяло предположить, что адресное воздействие на CCR6 способно не только стабилизировать заболевание, но и вызывать регрессию симптомов заболевания, характеризующегося демиелинизацией и/или инфильтрацией ЦНС мононуклеарными клетками, такого как рассеянный склероз.

**Пример 12** - Влияние гуманизованного mAb AB6 *in vivo* на модели псориаза, индуцированного IMIQUIMOD (IMQ)

Индукцированное IMQ воспаление кожи у мышей фенотипически схоже с псориазом (IMIQUIMOD-индуцированная модель псориаза (van der Fits, et al. The Journal of Immunology 2009 vol. 182 no. 9 5836-5845)). После нанесения IMQ на кожу в месте нанесения, обычно, спине, будут наблюдаться признаки эритемы, шелушения и утолщения. Обработанная IMQ кожа также демонстрирует повышенное утолщение эпидермиса, вызванное гиперпролиферацией кератиноцитов (van der Fits, et al. 2009). Воздействие IMQ на модели у мышей приводит к гиперпролиферации кератиноцитов и нарушению дифференцировки клеток эпидермиса (паракератозу), которая обычно проявляется задержкой ядер в роговом слое, отсутствием зернистого слоя и измененным паттерном экспрессии инволукрина (van der Fits et al. 2009). Эти заметные и измеримые признаки совпадают с характерной гистологической картиной

бляшковидного псориаза.

#### Исследование по предупреждению

Выбритую кожу спины мышей hCCR6 Tg ежедневно обрабатывали кремом IMQ или контрольным кремом (вазелин). На Фиг. 19 представлен фенотип кожи спины мышей через 7 дней лечения, при этом лечение начинали в день первого нанесения крема IMQ (то есть день 0). У мышей, которых ежедневно обрабатывали изотипическим контрольным антителом (5 мг/кг), наблюдалось утолщение эпидермиса, эритема и шелушение (крайнее справа), однако воздействие гуманизованного таb к hCCR6, hAB6, (3Mfc или 3SFc по 5 мг/кг) предотвращало утолщение эпидермиса, эритему и шелушение. (Б) Воздействие IMQ нарушает пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов. Мышей в течение 7 дней обрабатывали IMQ или вазелиновым кремом. Окрашивание H&E кожи спины мышей (контроль вазелин; IMQ + изотипический контроль или IMQ + hAB6 3Mfc) показало, что IMQ вызывает гиперпролиферацию кератиноцитов и нарушение дифференцировки, которые предотвращались hAB6 3Mfc. (В) IMQ индуцировал утолщение кожи спины. Антитело к hCCR6, как 3Mfc, так и 3SFc, существенно уменьшало утолщение кожи спины по сравнению с изотипическим контролем. Результаты позволяют предположить, что антитела к CCR6 предотвращают возникновение псориаза, и что данный эффект является независимым от функции Fc.

#### Исследование по терапии

Выбритую кожу спины мышей, трансгенных по hCCR6, ежедневно обрабатывали кремом IMQ или контрольным кремом (вазелин) и ежедневно давали изотипическое контрольное антитело (5 мг/кг) или гуманизованное таb к hCCR6 (3Mfc или 3SFc по 5 мг/кг), начиная с 6 дня после первого нанесения крема IMQ. В данном терапевтическом исследовании по терапии измеряли утолщение кожи спины, индуцированное IMQ, при этом оба антитела к hCCR6, hAB6 3Mfc или Fc KO (3SFc) существенно уменьшали утолщение кожи спины по сравнению с изотипическим контролем. Эти результаты показывают, что антитела к CCR6 по изобретению способны лечить псориаз и замедлять его прогрессирование (Фиг. 20).

#### **Пример 13** - Исследование ADCC *in vitro*

Цитолитическую способность истощающих антител hAB6 (IgG1 и IgG1 с оптимизацией Fc) сравнивали с неистощающим hAB6 (Fc KO) и изотипическим контролем. Показали, что истощающие антитела hAb6 обладали существенно более

высокой цитолитической способностью по сравнению с неистошающим или контрольным (Фиг. 21).

**Пример 14** - Исследование по терапии артрита.

Трансгенным по человеческому CCR6 мышам осуществляли инъекцию (в/б) 200 мкл сыворотки К/ВХН в 0 и 1 дни. Развитие артрита оценивали путем ежедневного измерения толщины голеностопного сустава и оценки клинического индекса до достижения конечной точки эксперимента. Когда у мышей наблюдались симптомы артрита, и кумулятивный клинический индекс достигал 4 (на 4 день), мышей делили на 2 группы: получавших инъекции изотипического контрольного mAb; получавших инъекции антитела к hCCR6-FcKO (синий) и получавших инъекции истошающего антитела к hCCR6 (зеленый) по 20 мг/кг массы тела и затем по 5 мг/кг через день в течение 1 недели. В качестве контроля мыши, которые не экспрессировали человеческий CCR6 (WT), получали внутривентральную инъекцию 200 мкл сыворотки К/ВХН в день 0 и 1 и истошающее антитело к hCCR6 (красный).

Репрезентативные изображения голеностопных суставов мышей при достижении конечной точки эксперимента.

Результаты, показанные на Фиг. 22, демонстрируют, что истошающее антитело к CCR6 существенно уменьшает симптомы и признаки артрита у мышей.

**Пример 15** - Аффинное созревание hBН12

Нуклеиновокислотные последовательности VH и VK hAB6 подвергали мутации с получением последовательностей VK 1-21, 1-23 и последовательности VH 3-3. Эти последовательности комбинировали с получением различных мутированных антител (Фиг. 23) или с VH либо VL hAB6 дикого типа, и/или с различными комбинациями мутированных VH 1-21, 1-23 или VL 3-3, соответственно. Описанные здесь антитела показаны как VH/VL: WT/3-3, 1-21/WT, 1-23/WT, 1-21/3-3 и 1-23/3-3. Аффинность этих полученных антител исследовали путем исследования связывания с клетками L1.2 с человеческим CCR6 при помощи проточной цитометрии.

Характеристики связывания hAB6 и мутантов hAB6-IgG1 с человеческим CCR6 осуществляли при помощи FACS-анализа связывания с использованием линии клеток, экспрессирующих человеческий CCR6 (L1.2 с человеческим CCR6). Приблизительно  $2,5 \cdot 10^5$  клеток hCCR6 L1.2/тест промывали буфером для связывания для FACS (FBB) (PBS, 0,5% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub> (pH 7,4)) и окрашивали hAB6 или мутантами hAB6 (4,4 мкг/мл) и с последовательным 3-кратным разведением антител. Через 1 ч инкубации на

льду клетки промывали FBB (pH 7,4) и конъюгированным с PE антителом к Fc человека (Jackson ImmunoResearch). Через 30 мин инкубации на льду клетки 3 раза промывали FBB (pH 7,4) и ресуспендировали в 1% формальдегиде и анализировали с применением проточного цитометра FACS LSR (BD Immunocytometry Systems). Значения EC<sub>50</sub> рассчитывали при помощи GraphPad Prism. Значения EC<sub>50</sub> (в нМ) составляли 3,4 (hAB6), 3,2 (WT/3.3), 0,46 (1-21/WT), 0,39 (1-23/WT), 0,41 (1-21/3-3) и 1,2 (1-23/3.3).

#### **Пример 16 - Исследование по терапии склеродермии**

Терапевтическую эффективность истощающих антител к CCR6 оценивали на модели индуцированной блеомицином склеродермии. Вкратце, мышам C57/BL6 в возрасте 6 недель давали акклиматизироваться в течение 7 дней в виварии.

Разводили блеомицин (BLM) (Sigma) до 200 мкг/мл при помощи PBS. Осуществляли подкожные инъекции 100 мкл блеомицина или PBS (несущая среда) мышам в один участок выбритой спины один раз в сутки в течение 28 дней. Затем мыши получали в/б инъекции mAb к человеческому CCR6 (hAB6, описанного в данном документе) по 5 мг/кг, 3 раза в неделю, начиная с 8 дня до 27 дня. Контрольные мыши получали в/б инъекции изотипического контроля или PBS. Схема протокола эксперимента показана на Фиг. 24а.

После обработки блеомицином обычно наблюдалась повышенная толщина, указывающая на склеродермию. Эта толщина нарастала и сохранялась при введении изотипического контрольного антитела. Однако, как показано на Фиг. 24б, толщина кожи спины существенно уменьшалась у мышей, которые после инъекции блеомицина получали антитело к человеческому CCR6.

На Фиг. 25 показаны результаты гистологической оценки мышей. На Фиг. 25а показано окрашивание ткани кожи гематоксилин-эозином, трихромное окрашивание по Массону и окрашивание пикросириусом красным, а на Фиг. 25б показано аналогичное окрашивание ткани легких.

Эти результаты указывают, что истощающие антитела к CCR6 по изобретению полезны для лечения и уменьшения симптомов склеродермии, включая системную склеродермию.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с CCR6 (хемокиновый рецептор 6), где предпочтительно антигенсвязывающий белок ингибирует связывание MIP-3 $\alpha$  (макрофагальный воспалительный белок 3 $\alpha$ ) с CCR6.

2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, где антигенсвязывающий домен связывается с пептидом, который:

- состоит из последовательности SEQ ID NO: 2; или

- состоит из последовательности в составе последовательности SEQ ID NO: 2, и указанный пептид является полезным в качестве иммуногена для создания антитела, способного связываться с CCR6.

3. Антигенсвязывающий белок по п. 1, где антигенсвязывающий домен связывается с:

- пептидом, состоящим из аминокислот с 1 до 28 CCR6, и/или

- пептидом, состоящим из аминокислот с 18 до 46 CCR6.

4. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-3, где CCR6 представляет собой человеческий CCR6.

5. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-3, содержащий:

FR1 - CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4 и

FR1a - CDR1a – FR2a – CDR2a – FR3a – CDR3a – FR4a,

где:

каждая из FR1, FR2, FR3 и FR4 представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1, CDR2 и CDR3 представляет собой область, определяющую комплементарность;

каждая из FR1a, FR2a, FR3a и FR4a представляет собой каркасную область;

каждая из CDR1a, CDR2a и CDR3a представляет собой область, определяющую комплементарность;

где последовательности любой из каркасных областей или областей, определяющих комплементарность, являются такими, как описано здесь.

6. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-5, содержащий:

FR1 - CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4 и

FR1a - CDR1a – FR2a – CDR2a – FR3a – CDR3a – FR4a,

где:

каждая из FR1, FR2, FR3 и FR4 представляет собой каркасную область;  
каждая из CDR1, CDR2 и CDR3 представляет собой область, определяющую комплементарность;

каждая из FR1a, FR2a, FR3a и FR4a представляет собой каркасную область;  
каждая из CDR1a, CDR2a и CDR3a представляет собой область, определяющую комплементарность;

где последовательность любой из областей, определяющих комплементарность, имеет аминокислотную последовательность, описанную в Таблице 1 или 2, и где предпочтительно каркасные области имеют аминокислотную последовательность, описанную в Таблице 3 или 4.

7. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-6, содержащий:

FR1 - CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4 – линкер - FR1a - CDR1a – FR2a – CDR2a – FR3a – CDR3a – FR4a.

8. Антигенсвязывающий белок по п. 7, где линкер представляет собой химическое соединение, одну или более аминокислот или дисульфидную связь, образованную между двумя остатками цистеина.

9. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH (вариабельная область тяжелой цепи), содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:11, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:12, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на

99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 88;

(3) VL (вариабельная область легкой цепи), содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 89;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

**10.** Антигенсвязывающий белок по п. 9, дополнительно содержащий по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:80, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:81, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 82, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 83;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в



SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 87;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87.

**11.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, где антигенсвязывающий белок содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 88 и 89.

**12.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на



меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 89;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96 или 97;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96 или 97, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

**13.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:11, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:12, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере



SEQ ID NO: 94, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98.

**14.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в

SEQ ID NO: 96 или 97;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 94, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 98;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96 или 97;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3,

содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96 или 97, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98.

**15.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где

CDR1 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (G/E)(F/Y)(T/S/P)F(S/K)(D/S)(Y/F)(Y/G), GF(S/T/P)FSDYY, GFTFSDYY (SEQ ID NO: 3), GFSFSDYY (SEQ ID NO: 6), GFPFSDYY (SEQ ID NO: 11) и EYTFKSFG (SEQ ID NO: 14);

CDR2 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: I(T/Y)(N/P)(G/R)(D/G/A/V/S)G(R/N)T, ITNG(D/G/A/V)GRT, ITNGDGRT (SEQ ID NO: 4), ITNGGGRT (SEQ ID NO: 7), ITNGAGRT (SEQ ID NO: 9), ITNGVGRT (SEQ ID NO: 12) и IYPRSGNT (SEQ ID NO: 15);

CDR3 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (T/A)(S/R)(P/S)P(L/Y)(G/D)G(A/-)(W/Y)F(G/A/D)Y, (A/T)SPPLGGAWF(G/A)Y, TSPPLGGAWFGY (SEQ ID NO: 5), ASPPLGGAWFGY (SEQ ID NO: 8), ASPPLGGAWFAY (SEQ ID NO: 10), TSPPLGGAWFAY (SEQ ID NO: 13) и ARSPYDGYFDY (SEQ ID NO: 16);

CDR1a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: QS(I/L)(V/L)H(S/I)NGNTY, QS(I/L)VHSNGNTY, QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 17), QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 20) и QSLHINGNTY (SEQ ID NO: 21);

CDR2a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (K/R)VS, RVS (SEQ ID NO: 22) и KVS (SEQ ID NO: 18); и

CDR3a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (F/S)Q(G/S)(S/T)HVP(L/R)T, FQGSHVPLT (SEQ ID NO: 19) и SQSTHVPRT (SEQ ID NO: 23).

**16.** Антигенсвязывающий белок по п. 15, где:

FR1 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS	(SEQ	ID	NO:	24),
EVNLVESGGGLVQPGGSLKLSCEAS	(SEQ	ID	NO:	25),
EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS	(SEQ	ID	NO:	26),
QDQLQQSGVALARPGASVKLSCKAS	(SEQ	ID	NO:	27),
EVNLVESGGGLVQPGGSLILSCEAS	(SEQ	ID	NO:	90) и
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS AAS	(SEQ	ID	NO:	80);

FR2 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: MYWVRQTPEKRLEWVTY (SEQ ID NO: 28), LYWVRQTPEKRLEWVTY (SEQ ID NO: 29), LYWVRQTPEKRLEWVAY (SEQ ID NO: 30), LGWVKQRPGQGLEWIGE (SEQ ID NO: 31) и LYWVRQAPGKGLEWVAY (SEQ ID NO: 81);

FR3 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: YYSDTVGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYYC (SEQ ID NO: 32), YYSDTIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAMYYC (SEQ ID NO: 33), YYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTSMYYC (SEQ ID NO: 34), YYNEKVKGVRLTADKSSNSVYMEFRSLTSEDSAVYFC (SEQ ID NO: 35), YYSDAIRGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAMYYC (SEQ ID NO: 91) и YYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRDEDTAVYYC (SEQ ID NO: 82);

FR4 имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: WGQGLTVTS (SEQ ID NO: 36) или WGQGTTLTVS (SEQ ID NO: 37);

FR1a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 38), DVSMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 39), DVVMTHSPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 40) и DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS (SEQ ID NO: 84);

FR2a имеет последовательность: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 41), LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 42) или LEWYLQKPGQSPRLLIY (SEQ ID NO: 85);

FR3a имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 43), KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 44), NRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO: 45) и KRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO: 86); и

FR4a имеет последовательность: FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 46), FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 47) или FGQGTKLEIR (SEQ ID NO: 87).

**17.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-5, который содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 48 - 59, 88, 89, 92, 93 и 96 - 98.

**18.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий





92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 55;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55.

**19.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере



SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56.

**20.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:3, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:7, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 50;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 57;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в

SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57.

**21.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:3, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:7, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 51;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на

92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 58;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58.

**22.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий

домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:3, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO:9, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10;

(2) VH, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 52;

(3) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере на 66%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере



мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56.

**23.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере



(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55.

**24.** Антигенсвязывающий белок по п. 23, дополнительно содержащий по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей каркасную область (FR) 1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 26, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 30, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36;

(2) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 46;

(3) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(4) VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; или

(5) VH, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и VL, содержащей FR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, FR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, FR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и FR4, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46.

**25.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий



меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 23;

(4) VL, содержащей последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 59;

(5) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59.

**26.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с CCR6 и где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одно из:

(1) VH, содержащей область, определяющую комплементарность (CDR) 1, содержащую последовательность по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере



SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(6) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92;

(7) VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19;

(8) VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93;

(9) VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; или

(10) VH, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92, и VL, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93.

27. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-26, который находится в форме:

(1) одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv);

(2) димерного scFv (di-scFv);

(3) одного из (1) или (2), связанного с константной областью антитела, Fc или константным доменом тяжелой цепи (CH) 2 и/или CH3; или

(4) одного из (1) или (2), связанного с белком, связывающимся с иммунной эффекторной клеткой;

(5) диатела;

(6) триатела;

(7) тетратела;

(8) Fab;

(9) F(ab')<sub>2</sub>;

(10) Fv;

(11) одного из (5) - (10), связанного с константной областью антитела, Fc или константным доменом тяжелой цепи (CH) 2 и/или CH3; или

(12) одного из (5) - (10), связанного с белком, связывающимся с иммунной эффекторной клеткой.



**28.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-26, представляющий собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

**29.** Антигенсвязывающий белок по п. 28, представляющий собой моноклональное антитело или его фрагмент, возможно, переменный домен.

**30.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности (в направлении от N к C концу или от C к N концу):

- SEQ ID NO: 88 и 89;
- SEQ ID NO: 96 и 98;
- SEQ ID NO: 97 и 98;
- SEQ ID NO: 88 и 98;
- SEQ ID NO: 96 и 89;
- SEQ ID NO: 97 и 89;
- SEQ ID NO: 48 и 55;
- SEQ ID NO: 49 и 56;
- SEQ ID NO: 50 и 57;
- SEQ ID NO: 51 и 58;
- SEQ ID NO: 52 и 56;
- SEQ ID NO: 53 и 55;
- SEQ ID NO: 54 и 59; или
- SEQ ID NO: 92 и 93.

**31.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-30, дополнительно содержащий Fc-область, сконструированную таким образом, чтобы обладать пониженной способностью индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

**32.** Антигенсвязывающий белок по п. 31, где Fc-область, сконструированная таким образом, чтобы обладать пониженной способностью индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), имеет мутации, делеции или модификации в положениях 234, 235 и 331 согласно последовательности SEQ ID NO:60 (где аланин находится в положении 118) или в положении, эквивалентном положениям 234, 235 и 331.

**33.** Антигенсвязывающий белок по п. 32, где мутации представляют собой L234F, L235E и P331S.

**34.** Антигенсвязывающий белок по п. 32, где Fс-область содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61.

**35.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-30, дополнительно содержащий Fс-область, сконструированную таким образом, чтобы обладать усиленной способностью индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

**36.** Антигенсвязывающий белок по п. 35, где усиленная способность индуцировать ADCC обусловлена мутацией, делецией или модификацией аминокислот в Fс-области, которая взаимодействует с Fс-рецептором.

**37.** Антигенсвязывающий белок по п. 36, где аминокислоты, которые подвергнуты мутации, делеции или модификации, находятся в положении 239, 330 и/или 332 согласно последовательности SEQ ID NO: 60 (где аланин находится в положении 118) или в положении, эквивалентном положениям 239, 330 и/или 332, где предпочтительно, аминокислотные мутации представляют собой S239D, A330L и I332E.

**38.** Антигенсвязывающий белок по п. 37, где Fс-область содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62.

**39.** Антигенсвязывающий белок по пп. 9 или 10, где Fс содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62.

**40.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 11 - 14, где Fс содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62.

**41.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-40, который находится в форме варибельного домена иммуноглобулина, антитела, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv-фрагмента, диатела, триатела, линейного антитела, молекулы одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела.

**42.** Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-41.

**43.** Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 42.

**44.** Клетка, содержащая вектор по п. 43 или нуклеиновую кислоту по п. 36.

**45.** Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по

любому из пп. 1-41 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

**46.** Способ лечения или предупреждения состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6, включающий введение субъекту, которому это необходимо, антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-41 или фармацевтической композиции по п. 45, тем самым обеспечивая у субъекта лечение или предупреждение состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6.

**47.** Способ по п. 46, где заболевание или состояние, связанное с экспрессией CCR6, представляет собой воспалительное состояние, аутоиммунное заболевание, инфекцию, фиброз или рак, или легочные нарушения.

**48.** Способ по п. 47, где воспалительное состояние представляет собой воспалительное состояние сердечно-сосудистой системы, воспалительное состояние желудочно-кишечного тракта, воспалительные нарушения печени, воспаление легких, воспаление почки, воспаление глаза, воспаление поджелудочной железы, воспалительное состояние мочеполовой системы, нейровоспалительное расстройство, аллергию, скелетное воспаление, воспаление, вызванное инфекцией, воспаление, вызванное или развившееся в ответ на трансплантацию.

**49.** Способ по п. 47, где аутоиммунное заболевание представляет собой синдром приобретенного иммунодефицита, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ATP), болезнь Бехчета, кардиомиопатию, целиакию-спру - герпетиформный дерматит; синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD), рубцующийся пемфигоид, холодовую агглютининовую болезнь, CREST-синдром, болезнь Крона, болезнь Дега, ювенильный дерматомиозит, дискоидную волчанку, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, фибромиалгию/фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), IgA-нефропатию, инсулинозависимый сахарный диабет, ювенильный хронический артрит (болезнь Стилла), ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз,

миастению гравис, пернициозную анемию, узелковый периартериит, полихондрит, полигландулярный синдром, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию (прогрессирующий системный склероз (PSS), также известный как системный склероз (SS)), синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, системную красную волчанку, артериит Такаясу, гигантоклеточный височный артериит, неспецифический язвенный колит, увеит, витилиго или гранулематоз Вегенера.

**50.** Способ по п. 47, где аутоиммунное заболевание представляет собой псориаз.

**51.** Способ по п. 47, где аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз.

**52.** Способ по п. 47, где фиброз представляет собой легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз, муковисцидоз, цирроз, эндомиокардиальный фиброз, перенесенный инфаркт миокарда, фиброз предсердия, фиброз средостения, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, нефрогенный системный фиброз, болезнь Крона, келоид, склеродермию/системный склероз, артрофиброз, болезнь Пейрони, контрактуру Дюпюитрена или адгезивный капсулит.

**53.** Набор или изделие, содержащие антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-41 или фармацевтическую композицию по п. 45.

**55.** Применение антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1 - 41 в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного состояния, аутоиммунного заболевания, инфекции, фиброза или рака, легочных нарушений или состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6, предпочтительно, где заболевание представляет собой воспалительное или аутоиммунное заболевание.

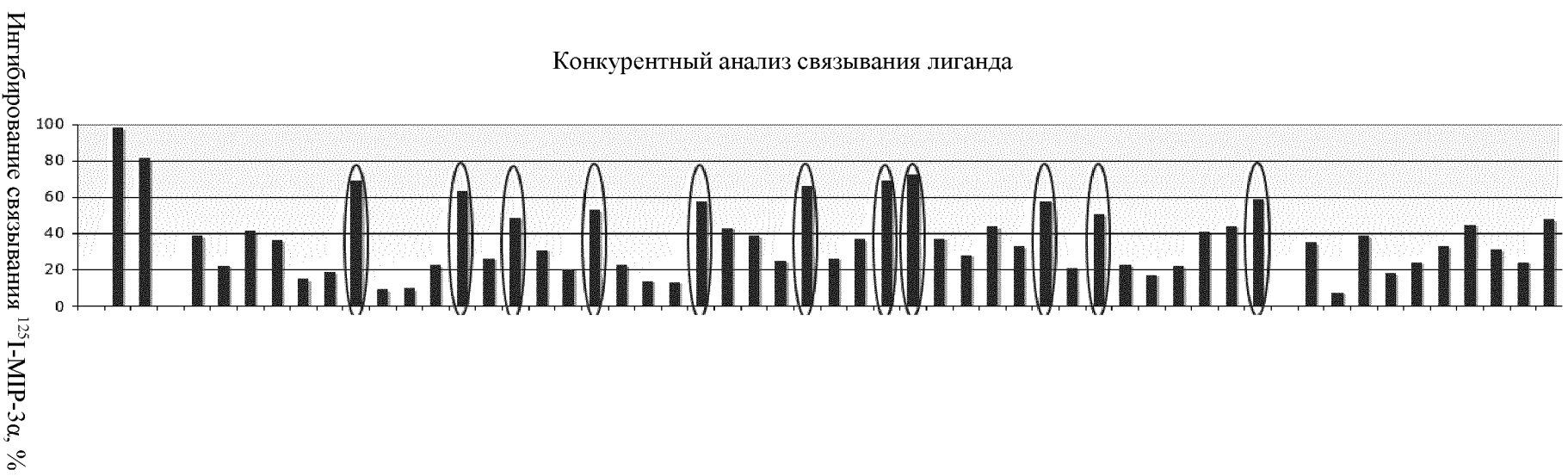
**55.** Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 41 для применения в лечении воспалительного состояния, аутоиммунного заболевания, инфекции, фиброза или рака, легочных нарушений или состояния или заболевания, связанного с экспрессией CCR6.

**56.** Применение по п. 54 или антигенсвязывающий белок для применения по п. 55, где аутоиммунное заболевание представляет собой псориаз.

**57.** Применение по п. 54 или антигенсвязывающий белок для применения по п.

55, где аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз.

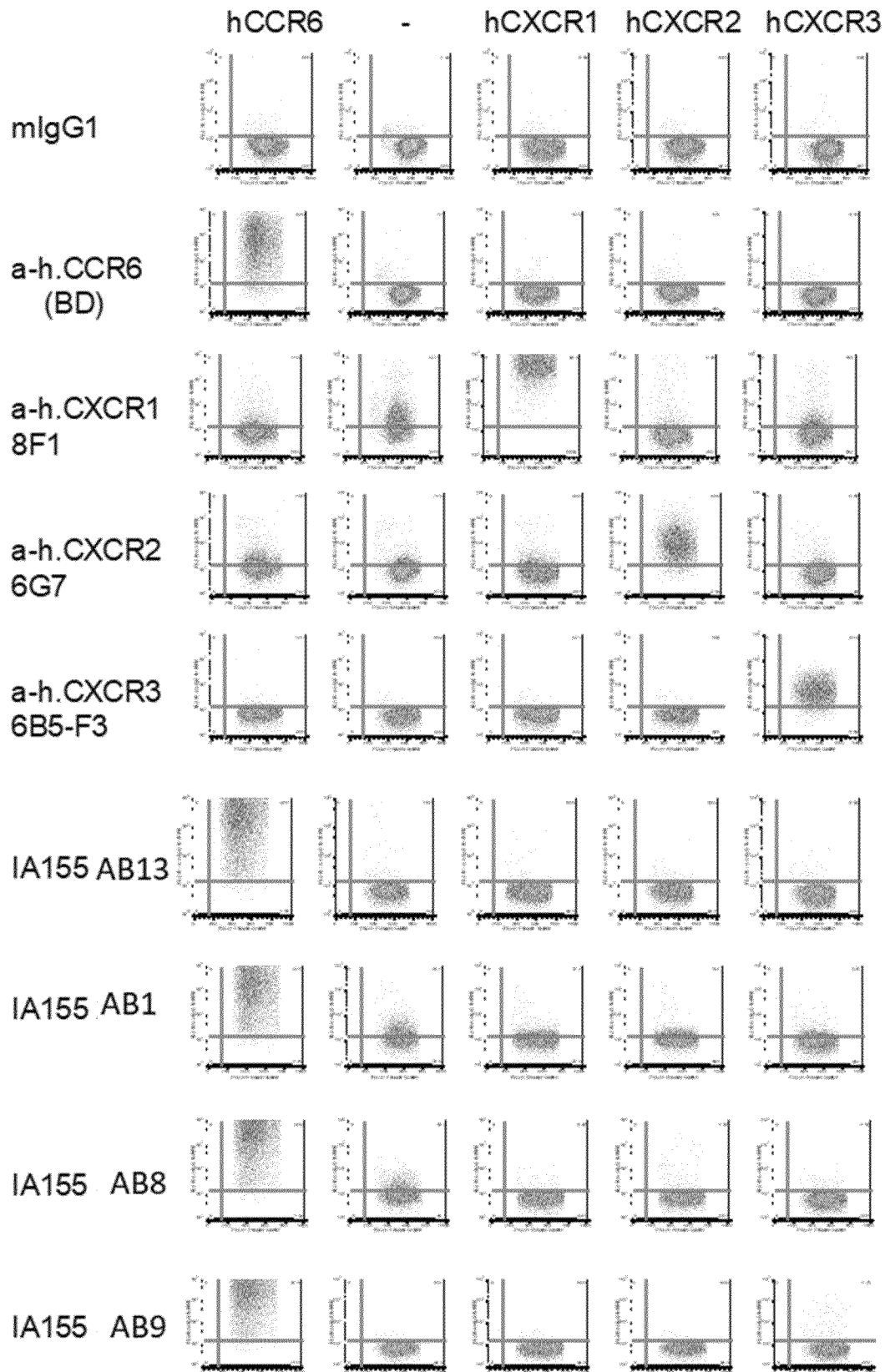
Фиг. 1



Фиг. 2

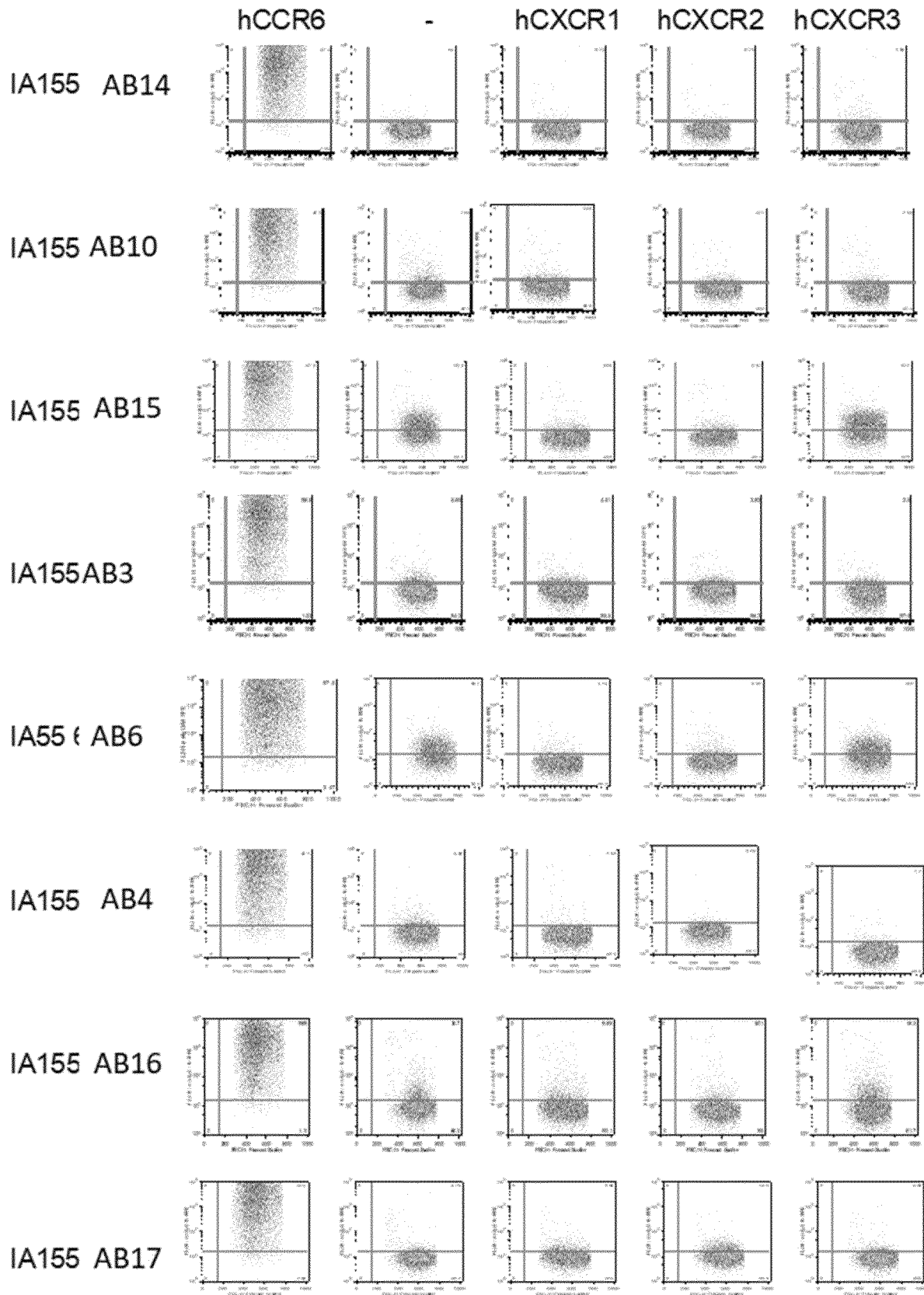


Фиг. 3

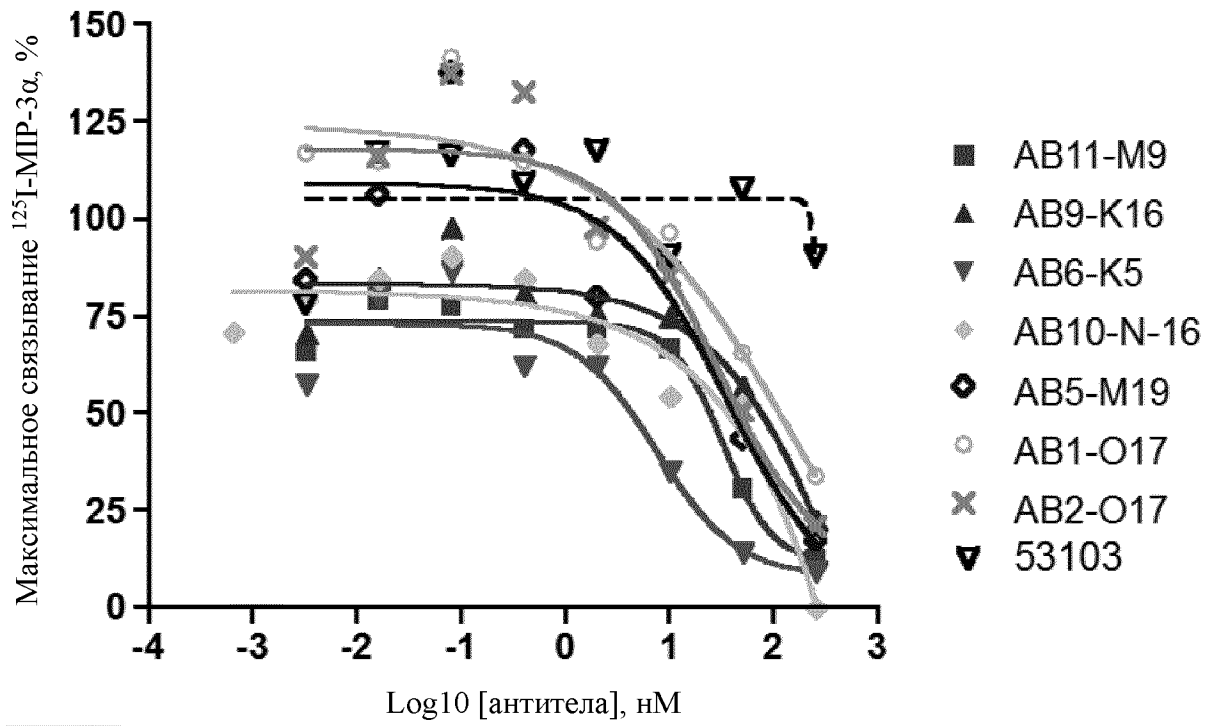




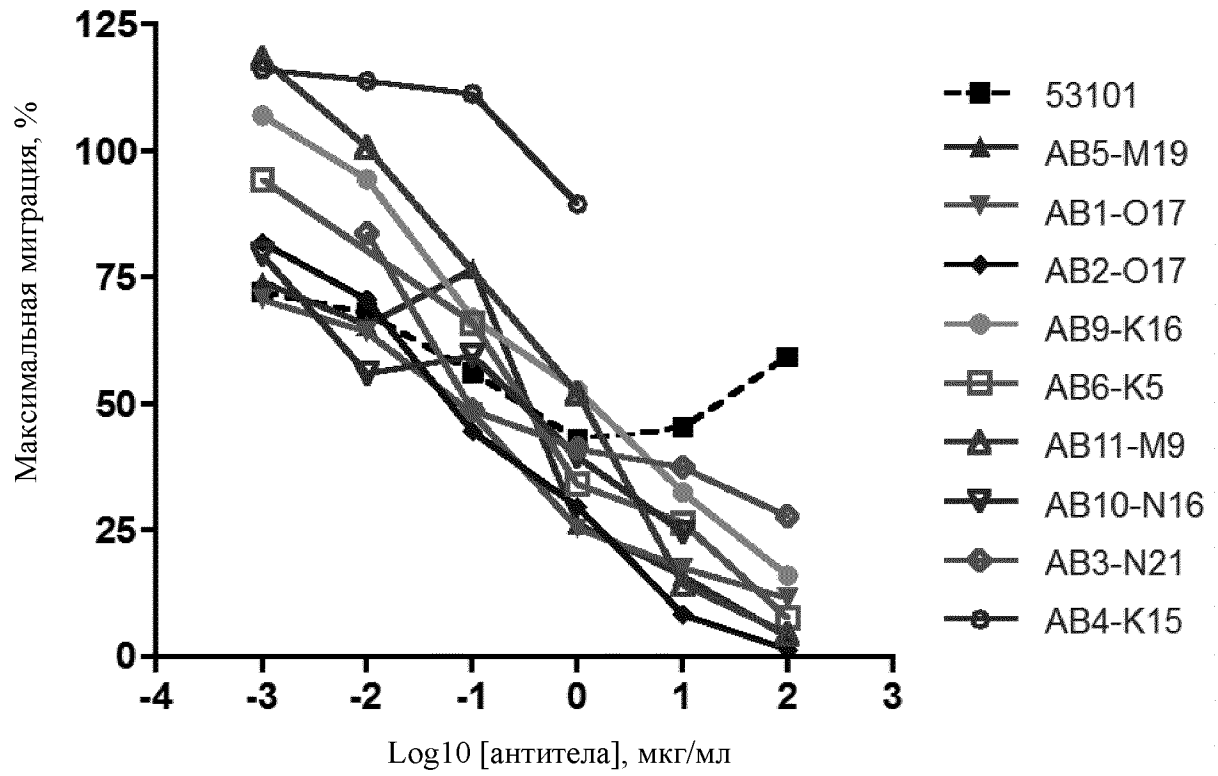
Фиг. 4



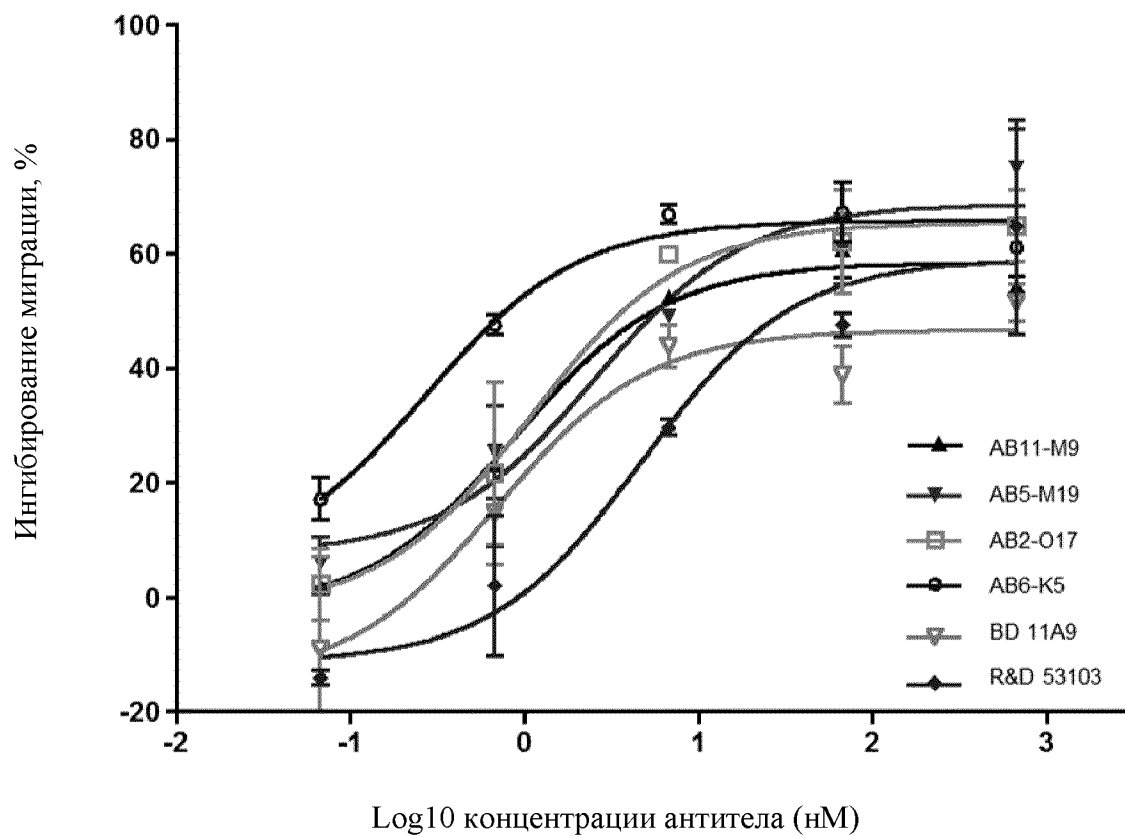
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



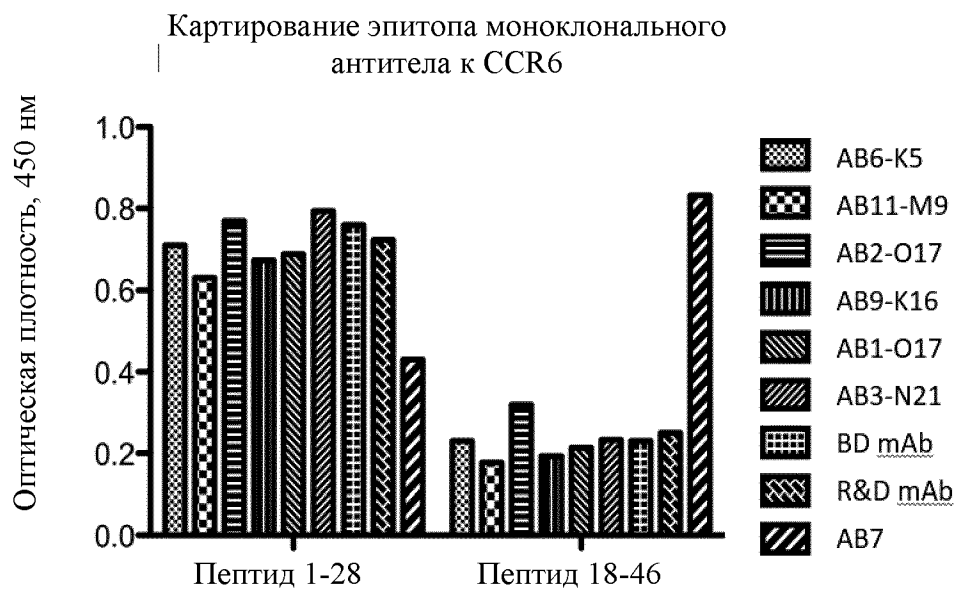
	AB11-M9	AB5-M19	AB2-O17	AB6-K5	BD 11A9	R&D 53103
EC50	0.8708	2.503	1.062	0.2691	0.6912	4.680

Фиг. 8

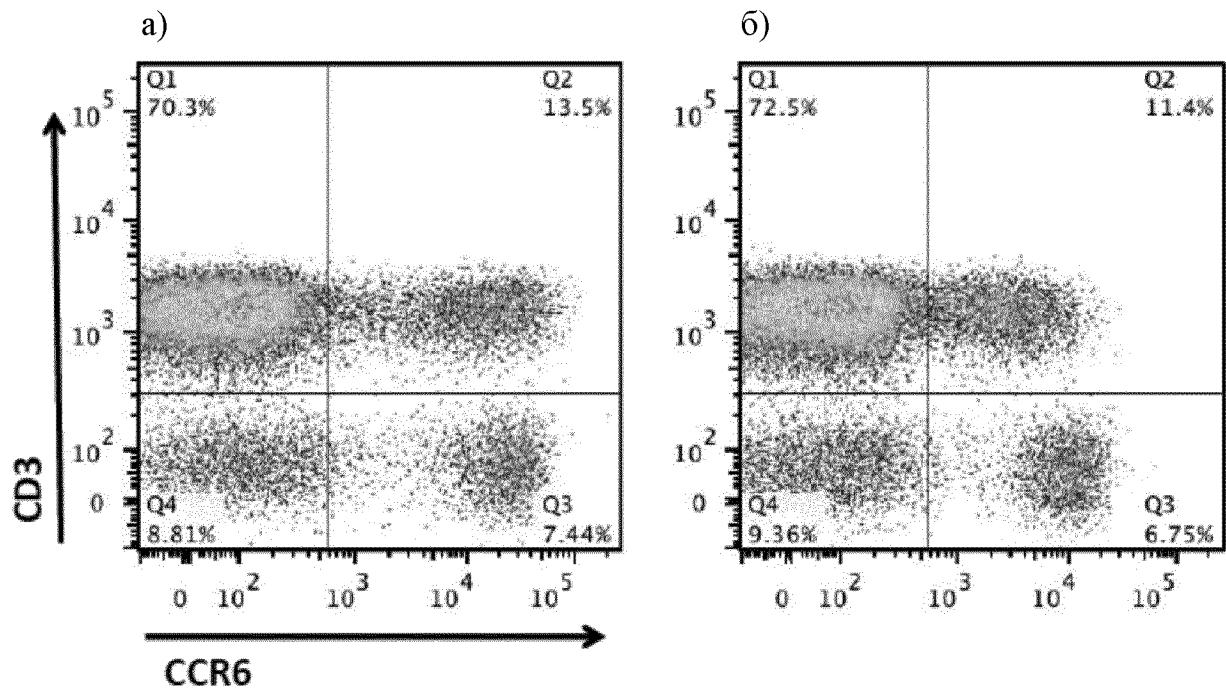
пептид hCCR 1-28

пептид hCCR 18-46

N-концевая область: MSGESMNFSDVFDSSDYFASVNTSYITVDSEMLLCTLHEVRQFSR

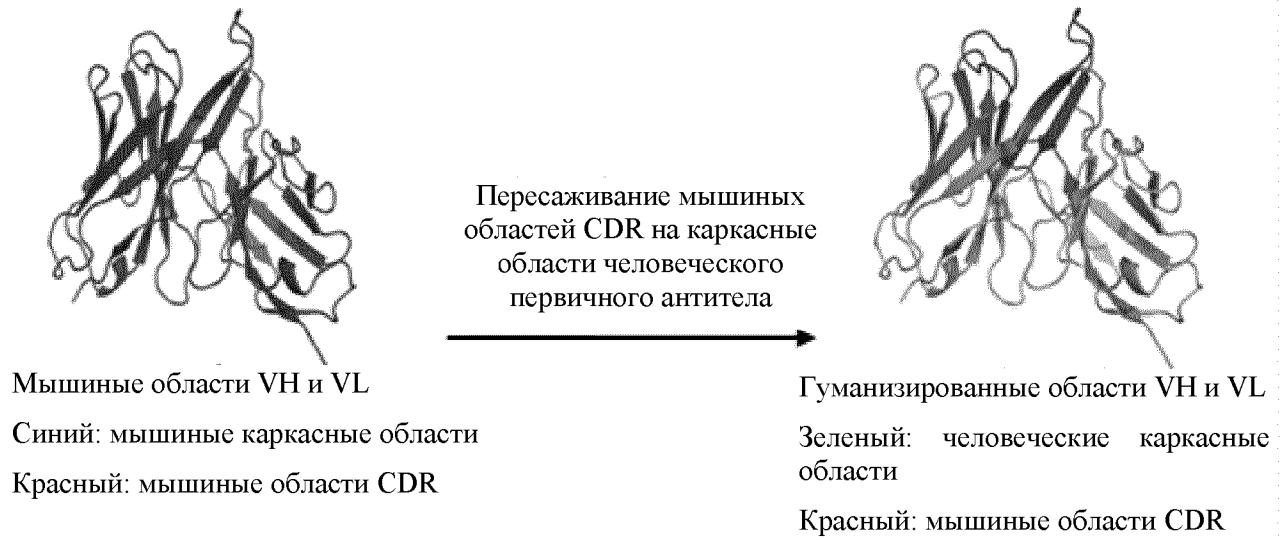


Фиг. 9



Фиг. 10

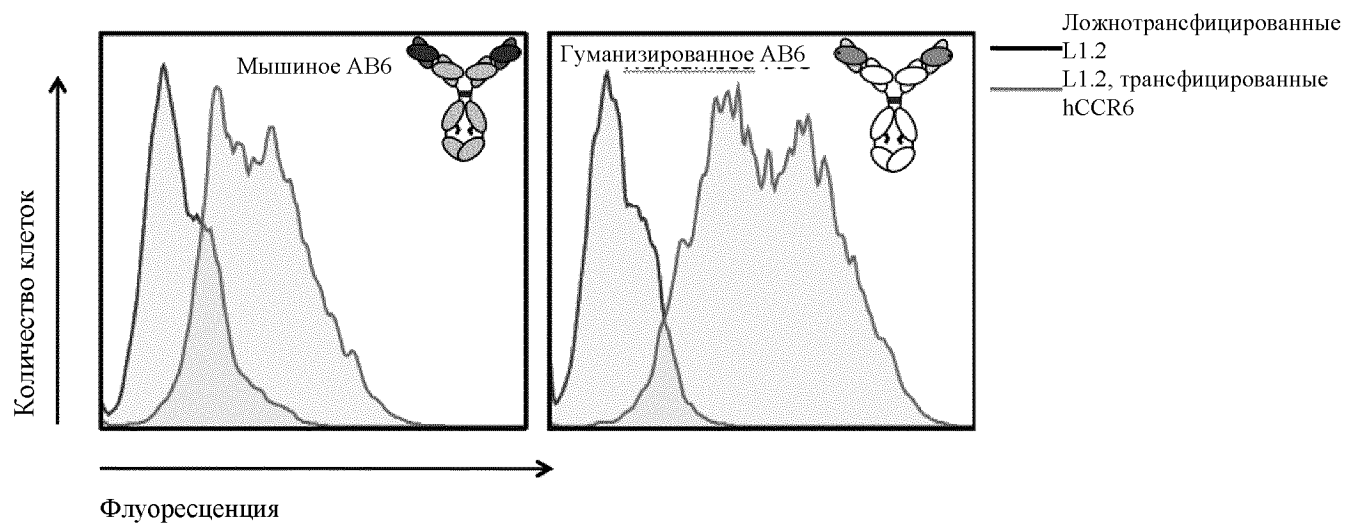
## Гуманизация антитела к CCR6



% гомологии с наиболее близкими V-генами человеческого первичного антитела		
	До гуманизации	После гуманизации
AB6-K	73 % (80.7 %) #	84 % (100 %)
AB6_VH	77 % (79 %)	85 % (100 %)

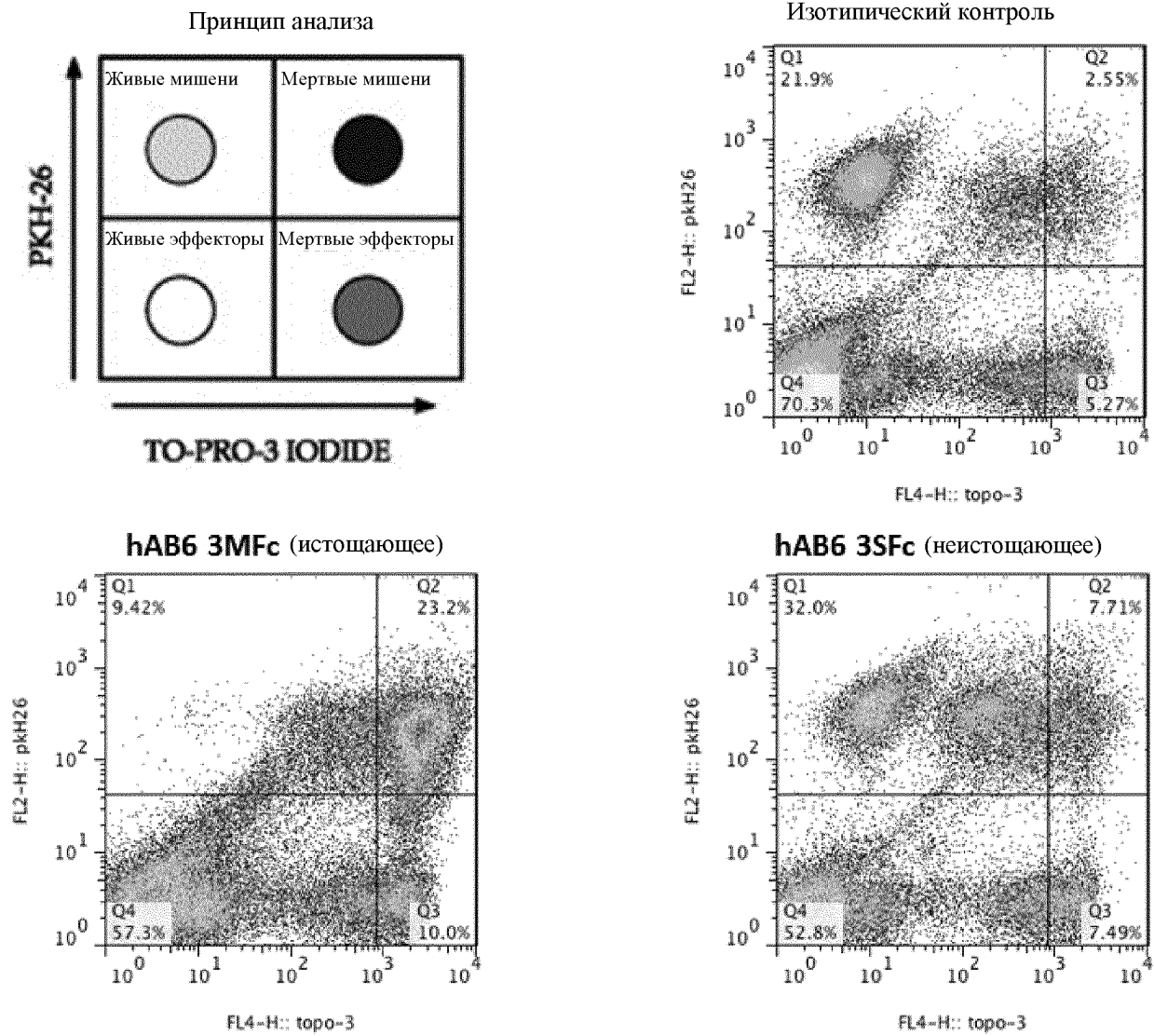
# в скобках указан процент гомологии без учета CDR

Фиг. 11

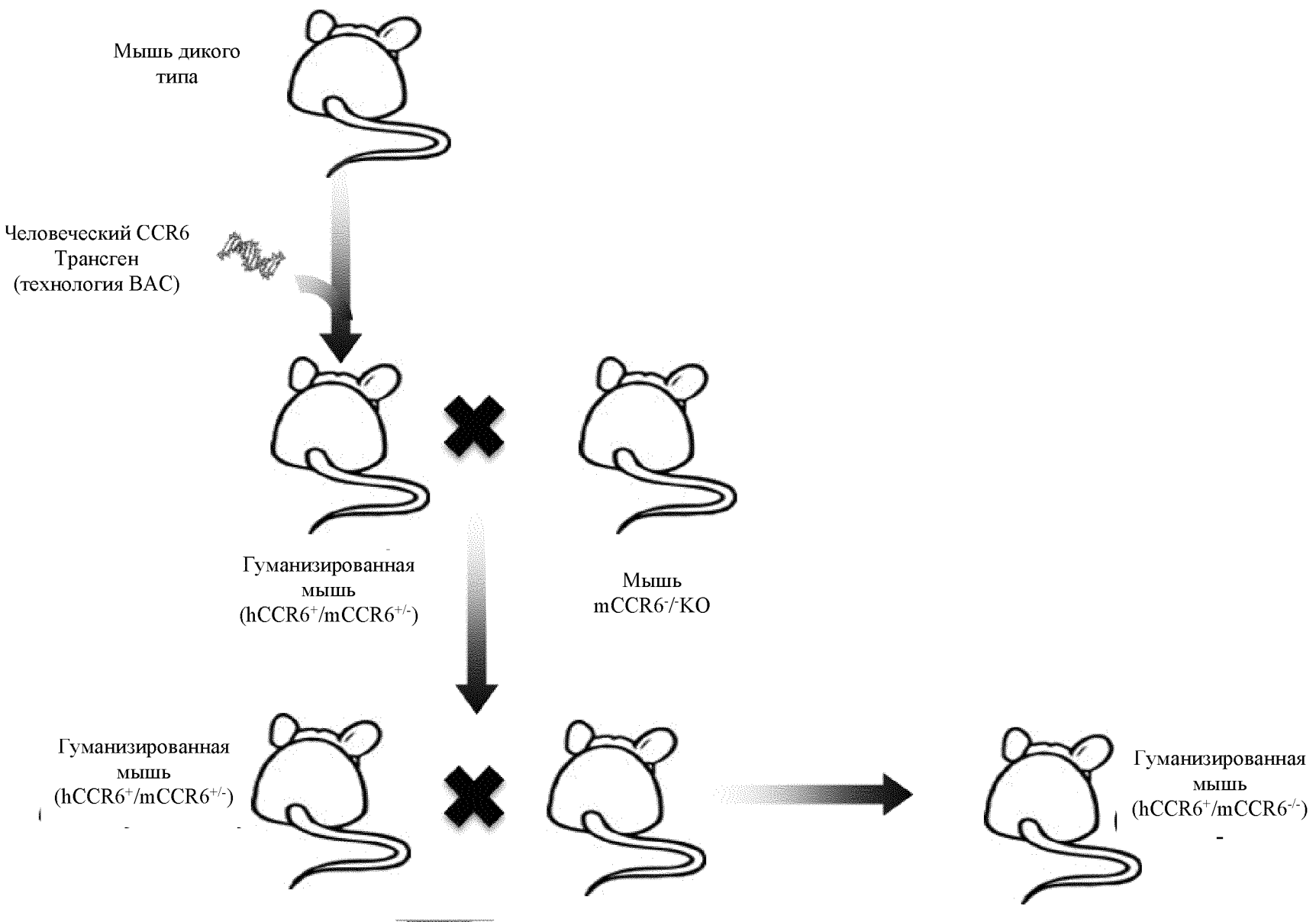




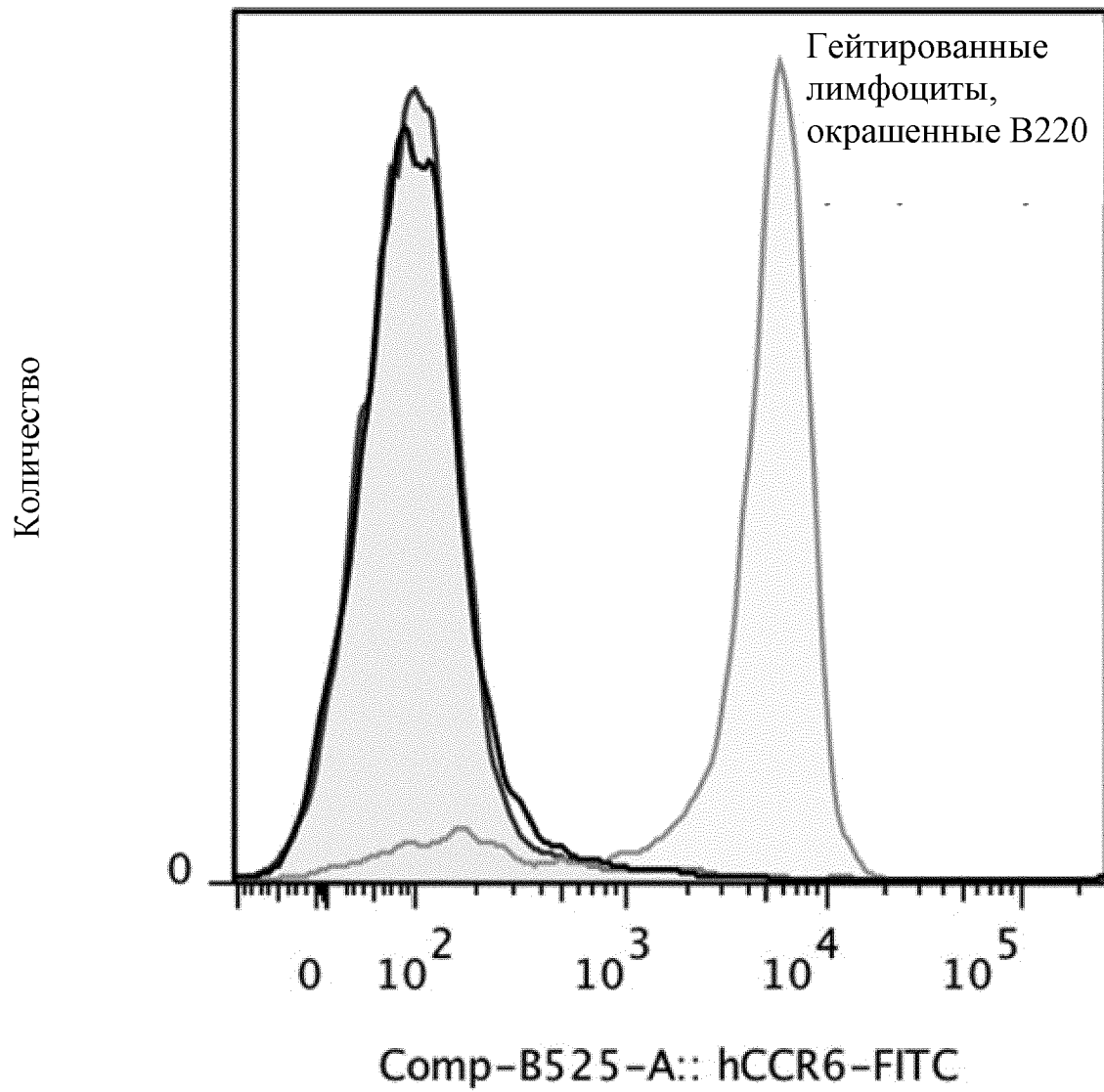
Фиг. 12



Фиг. 13

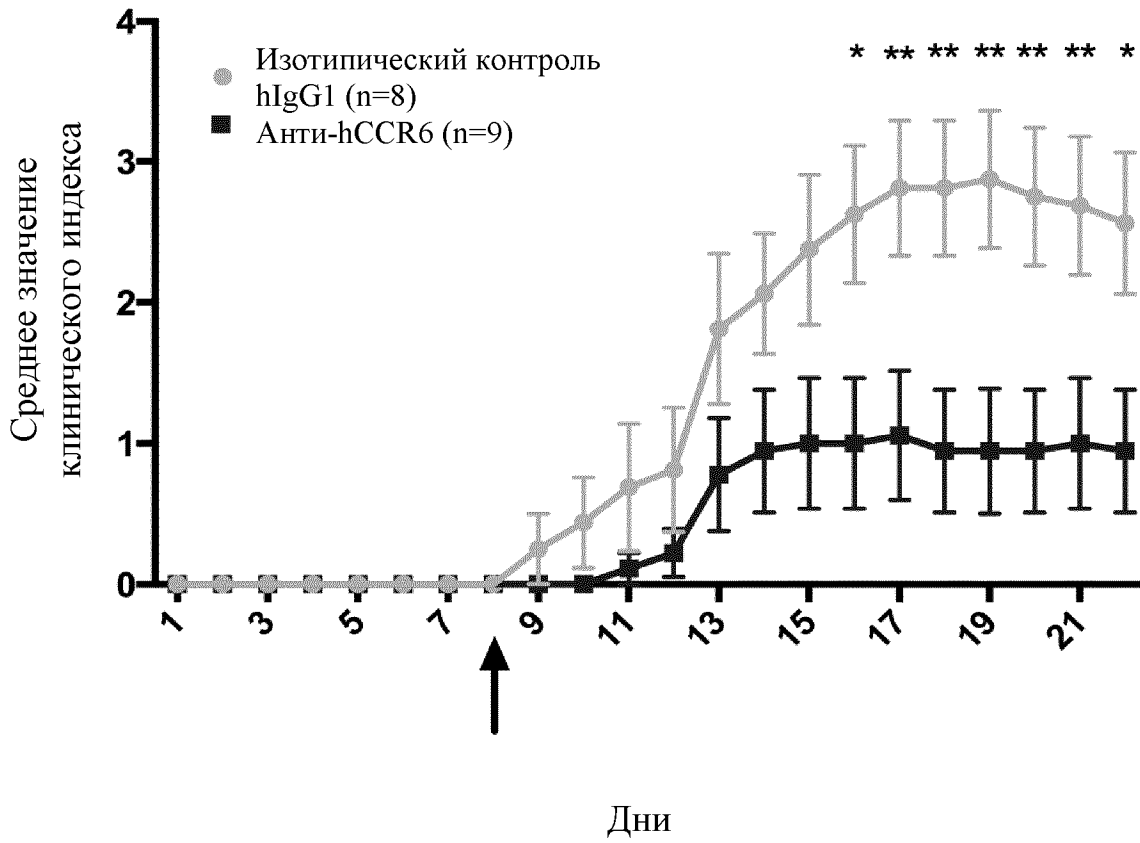


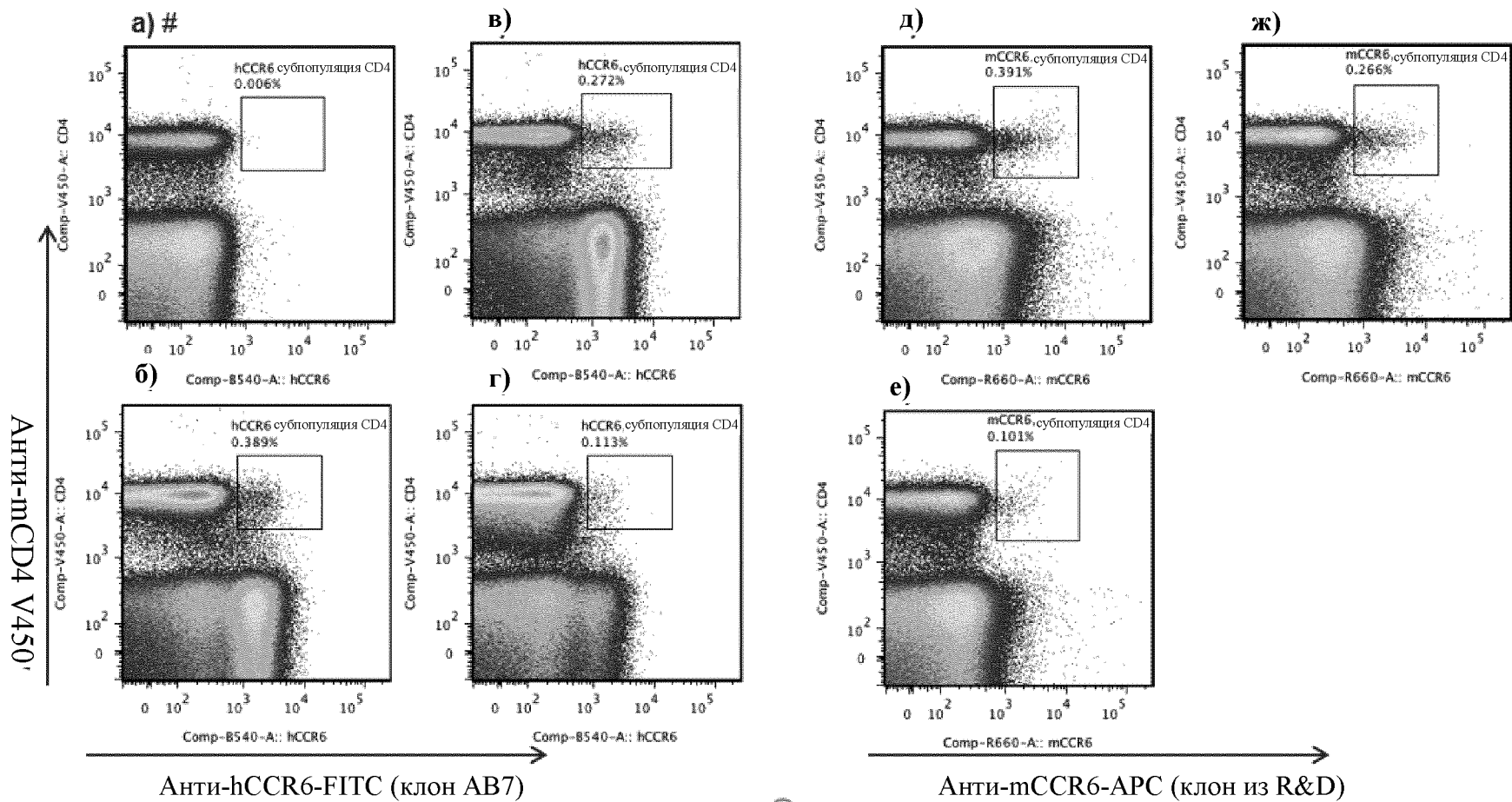
Фиг. 14

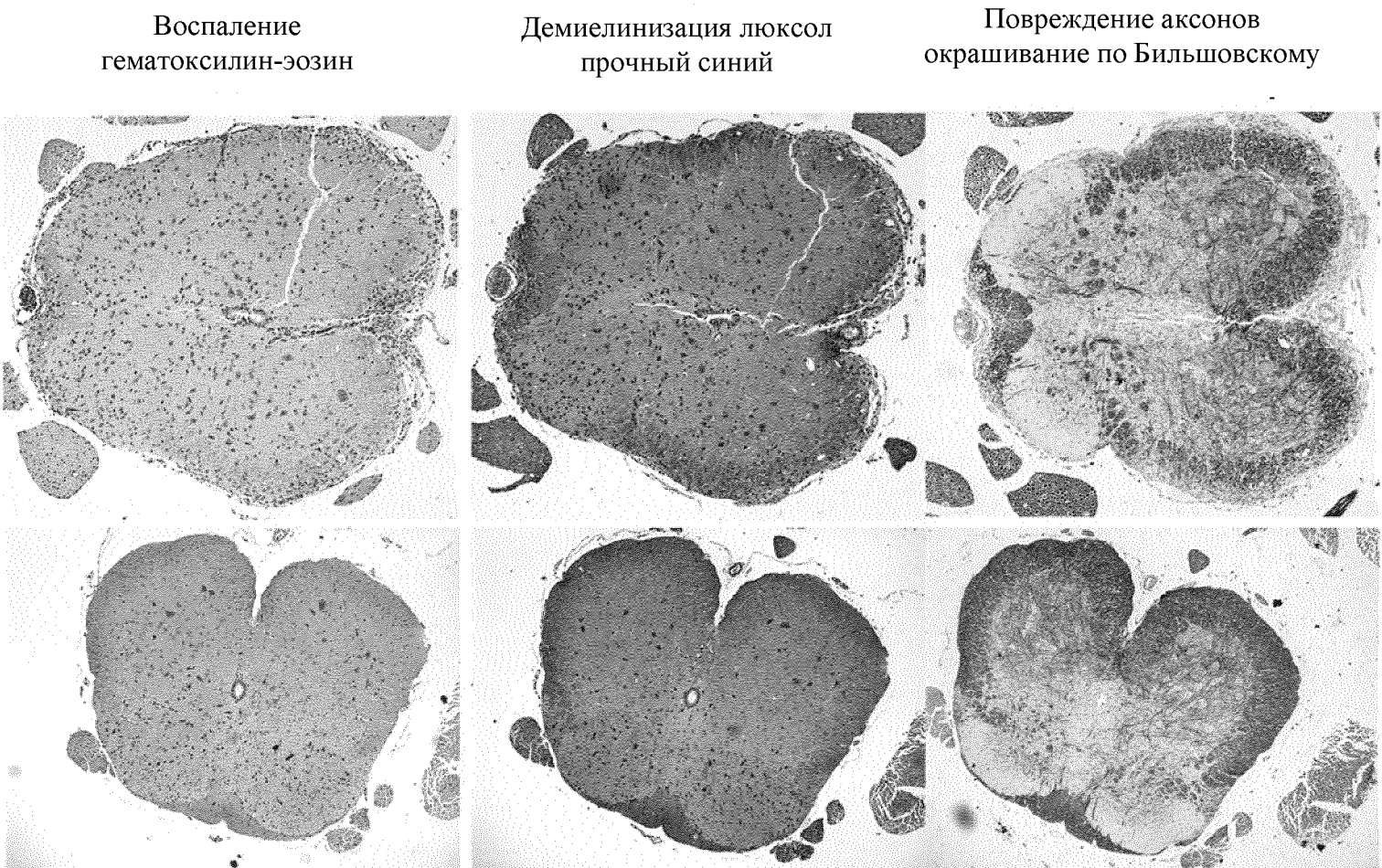


Фиг. 15

### Профилактика ЭАЭ через hCCR6





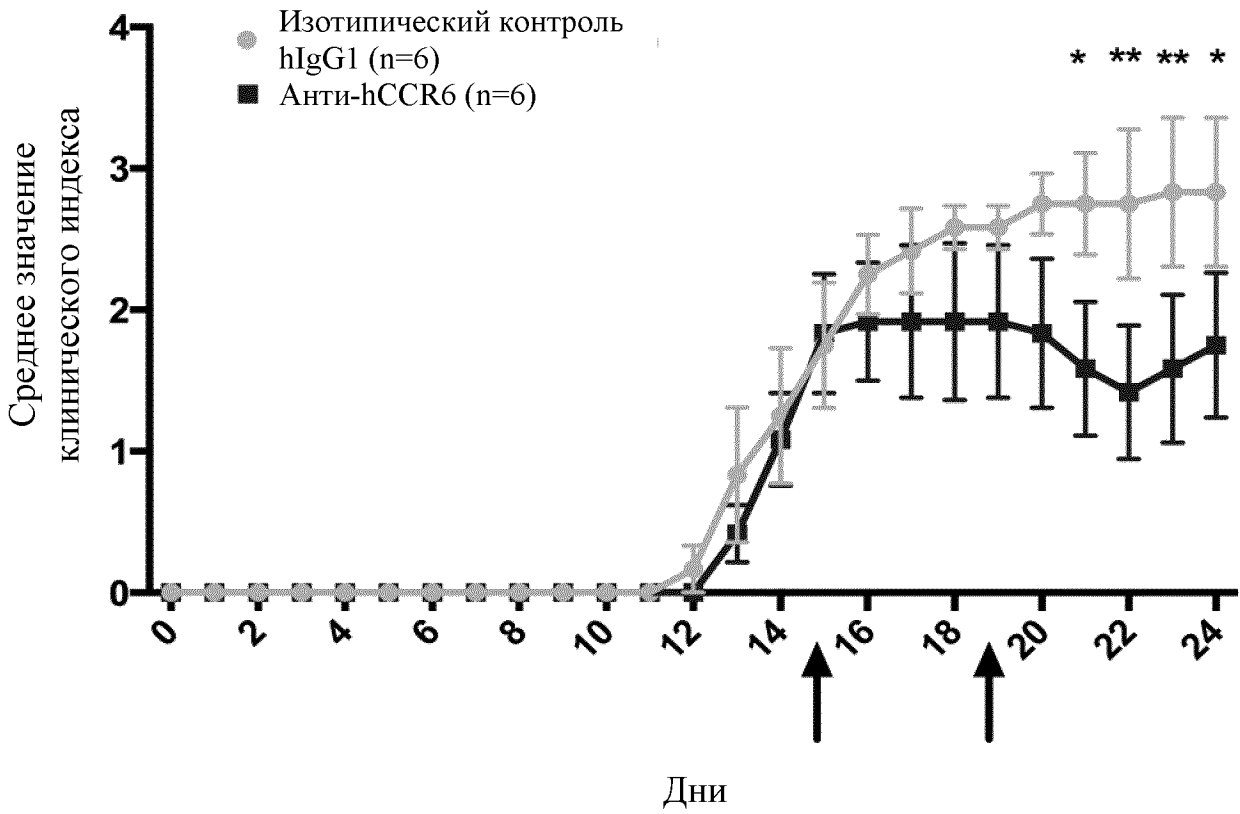


Изотипический контроль

Анти-hCCR6

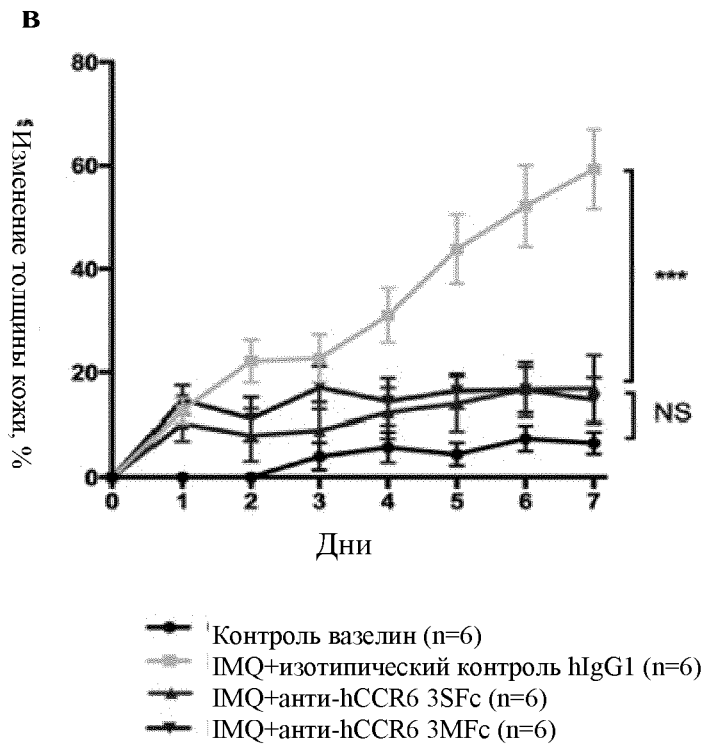
Фиг. 18

## Терапия ЭАЭ через hCCR6



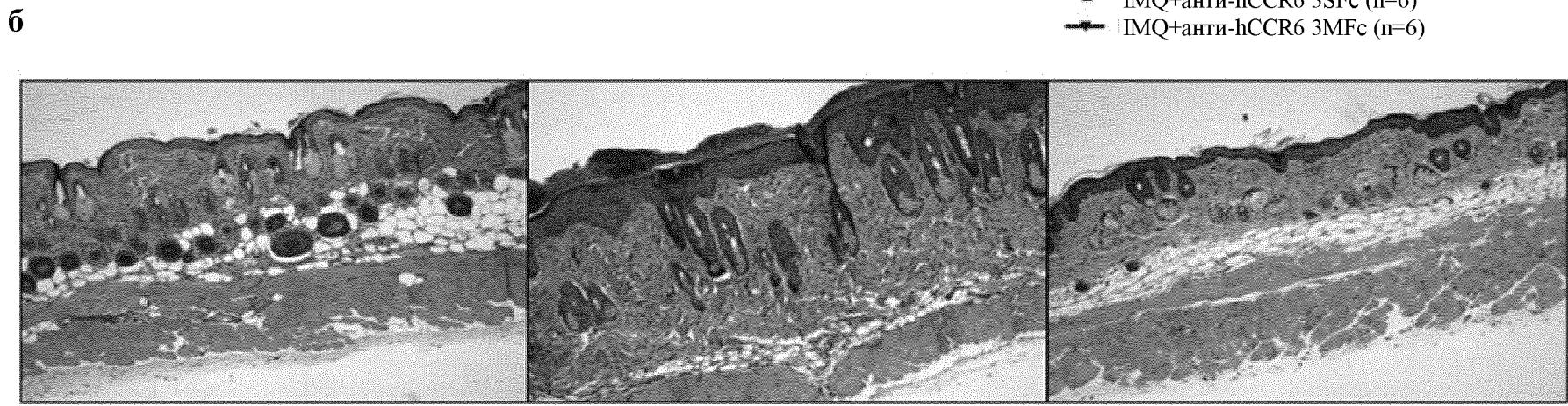


Контроль вазелин      IMQ+hAB6 3Mfc      IMQ+hAB6 3sFc      IMQ+изотип. контроль



—●— Контроль вазелин (n=6)  
 —■— IMQ+изотипический контроль hIgG1 (n=6)  
 —▲— IMQ+анти-hCCR6 3sFc (n=6)  
 —◆— IMQ+анти-hCCR6 3Mfc (n=6)

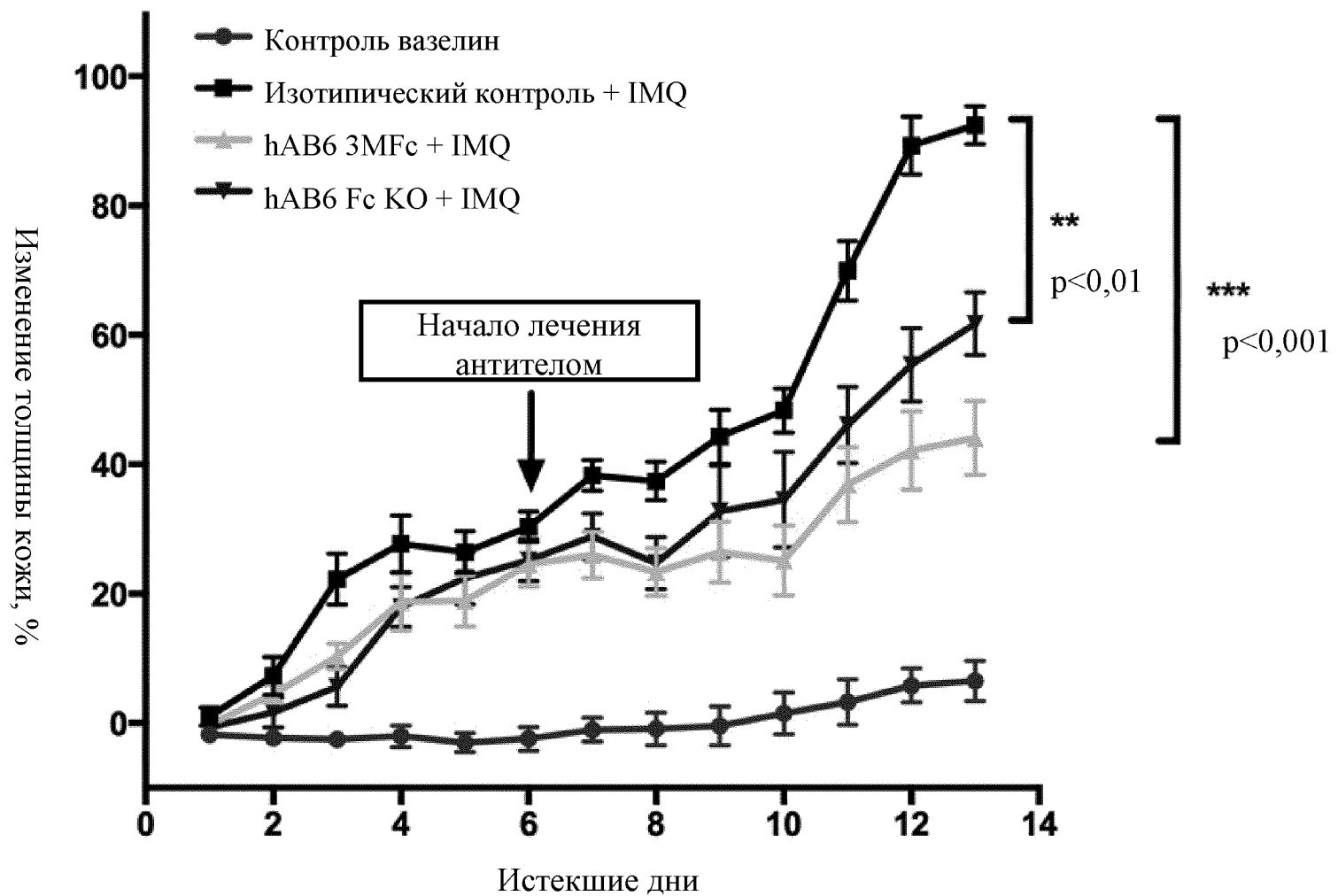
Фиг. 19



Контроль вазелин      IMQ + изотипический контроль      IMQ + hAB6 3Mfc

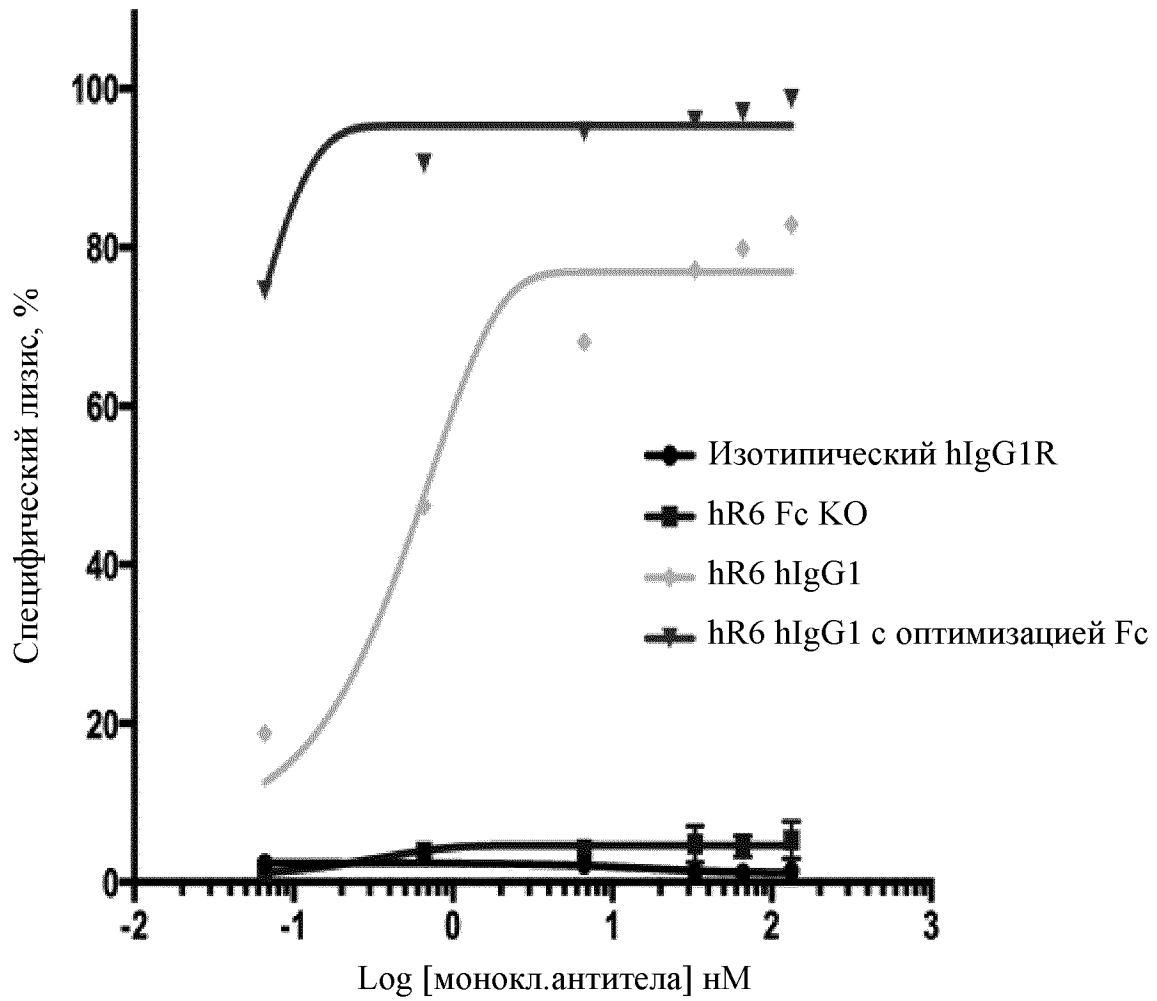
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ  
к ответу на запрос от 5.10.2023



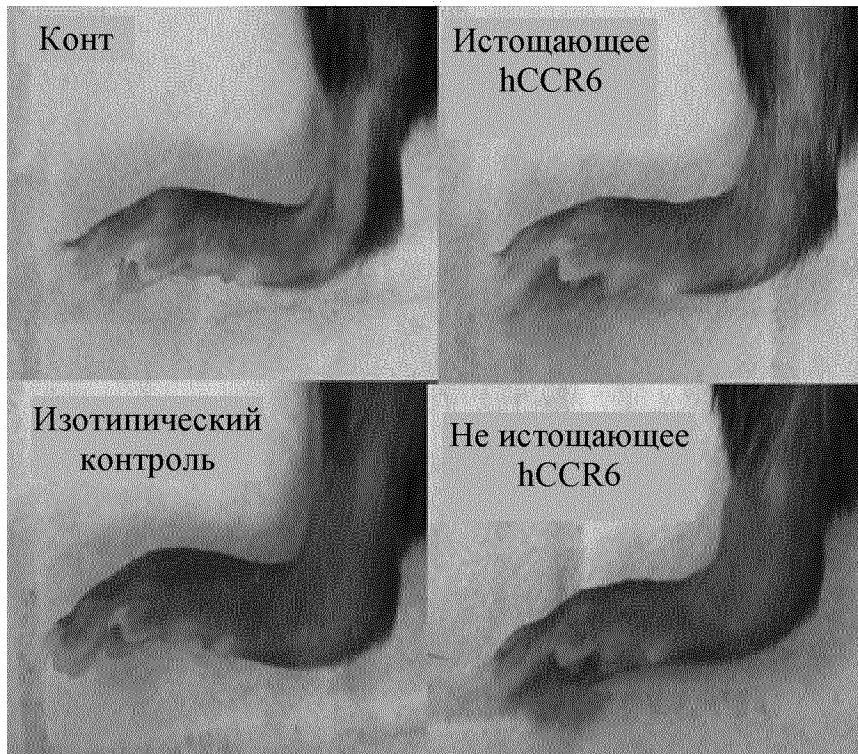
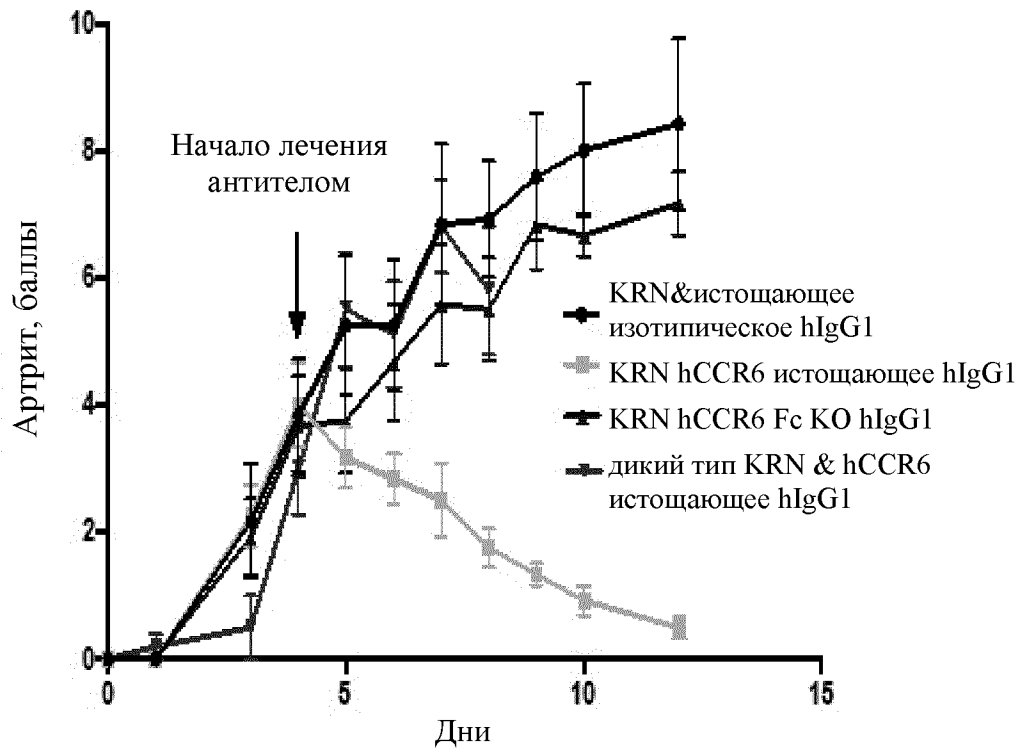


Фиг. 20

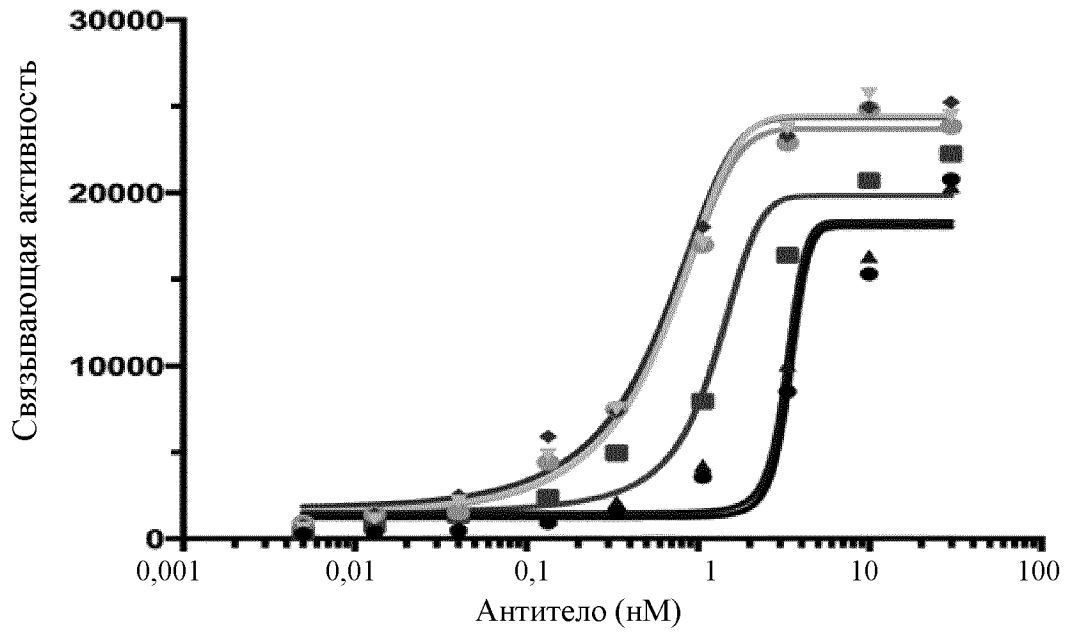
Фиг. 21



Фиг. 22

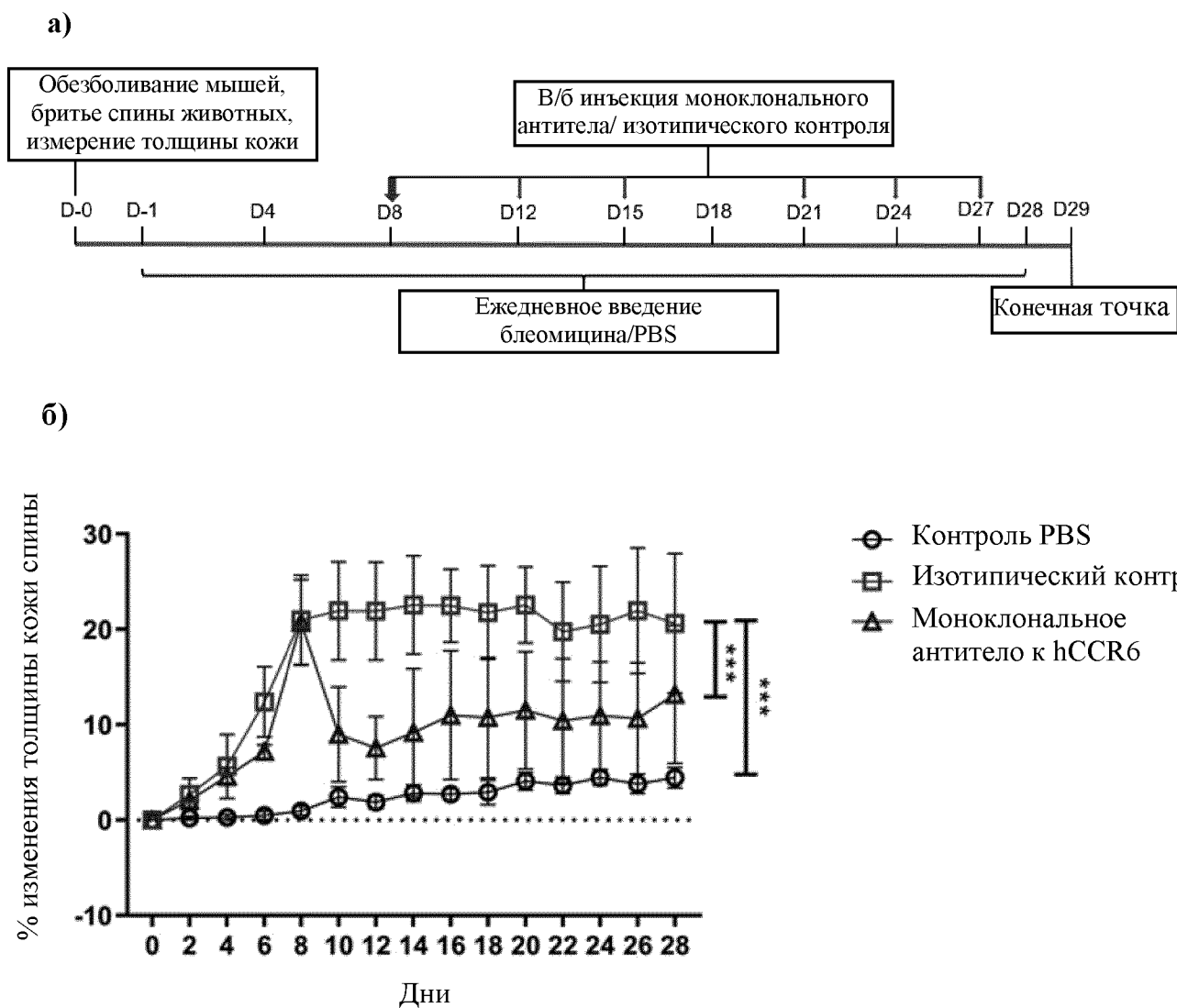


Фиг. 23



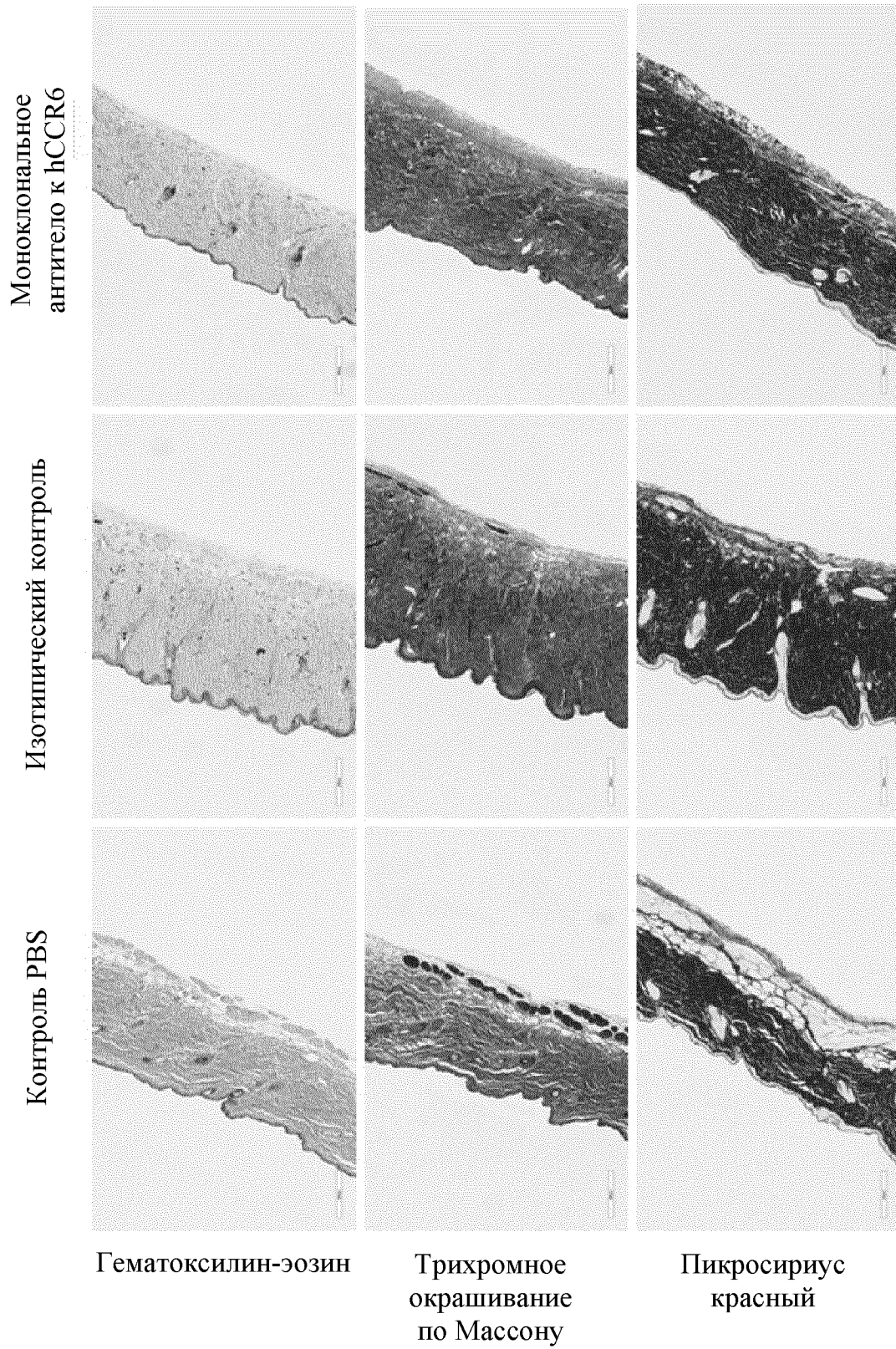
●	hAB6	EC50=3.4
▲	WT/3-3	EC50=3.2
▽	1-21/WT	EC50=0.46
◆	1-23/WT	EC50=0.39
●	1-21/3-3	EC50=0.41
■	1-23/3-3	EC50=1.2

Фиг. 24



Фиг. 25

а)



Фиг. 25 (продолж.)

б)

