

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392933

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.11

(51) Int. Cl. C07K 16/40 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.26

(54) АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С БЕЛКОМ ASM

(31) 10-2021-0068075; 10-2022-0047295

(72) Изобретатель:

(32) 2021.05.27; 2022.04.18

Хон Сын Бом, Хон Ми Рим (KR)

(33) KR

(86) PCT/KR2022/095105

(74) Представитель:

(87) WO 2022/250520 2022.12.01

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

ИСУ АБКСИС КО., ЛТД. (KR)

(57) Настоящее изобретение относится к антителу, специфично связывающемуся с белком кислой сфингомиеллиназы (ASM), причём указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению специфично связываются с белком ASM с высокой аффинностью и, таким образом, могут быть эффективно использованы для выявления указанного белка ASM или диагностики заболевания, возникающего из-за сверхэкспрессии указанного белка ASM.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжёлой цепи

Антитело	CDR1	CDR2
9101	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYAMHWVRQAPGKGLWVSQIYFGSGRKYADSVKGRF	
9102	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYAMHWVRQAPGKGLWVSQIYFGSGRKYADSVKGRF	
9104	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYAMHWVRQAPGKGLWVSQIYFGSGRKYADSVKGRF	
9108	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYAMHWVRQAPGKGLWVSQIYFGSGRKYADSVKGRF	
9113	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYAMHWVRQAPGKGLWVSQIYFGSGRKYADSVKGRF	
9123	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYAMHWVRQAPGKGLWVSQIYFGSGRKYADSVKGRF	
9101	TISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKMHYRF	DRWGQGLTIVTSS
9102	TISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKMHYRF	DRWGQGLTIVTSS
9104	TISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKMHYRF	DRWGQGLTIVTSS
9108	TISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKMHYRF	DRWGQGLTIVTSS
9113	TISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKMHYRF	DRWGQGLTIVTSS
9123	TISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKMHYRF	DRWGQGLTIVTSS

Аминокислотная последовательность варибельной области лёгкой цепи

Антитело	CDR1	CDR2
9101	QSVLTQPPASAGTPEGQRTVISCQSSSNIIGNNIVSYVYQQLPGTAPKLLIYDINSKRFSPVDFRFSGSKSG	
9102	QSVLTQPPASAGTPEGQRTVISCQSSSNIIGNNIVSYVYQQLPGTAPKLLIYDINSKRFSPVDFRFSGSKSG	
9104	QSVLTQPPASAGTPEGQRTVISCQSSSNIIGNNIVSYVYQQLPGTAPKLLIYDINSKRFSPVDFRFSGSKSG	
9108	QSVLTQPPASAGTPEGQRTVISCQSSSNIIGNNIVSYVYQQLPGTAPKLLIYDINSKRFSPVDFRFSGSKSG	
9113	QSVLTQPPASAGTPEGQRTVISCQSSSNIIGNNIVSYVYQQLPGTAPKLLIYDINSKRFSPVDFRFSGSKSG	
9123	QSVLTQPPASAGTPEGQRTVISCQSSSNIIGNNIVSYVYQQLPGTAPKLLIYDINSKRFSPVDFRFSGSKSG	
9101	TSASLAISGLRSEDEADYCSQNDYSLIAAVYFGGQTKLTVL	
9102	TSASLAISGLRSEDEADYCSQNDYSLIAAVYFGGQTKLTVL	
9104	TSASLAISGLRSEDEADYCSQNDYSLIAAVYFGGQTKLTVL	
9108	TSASLAISGLRSEDEADYCSQNDYSLIAAVYFGGQTKLTVL	
9113	TSASLAISGLRSEDEADYCSQNDYSLIAAVYFGGQTKLTVL	
9123	TSASLAISGLRSEDEADYCSQNDYSLIAAVYFGGQTKLTVL	

A1

202392933

202392933

A1

## АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С БЕЛКОМ ASM

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

#### 5 1. Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, специфично связывающимся с кислой сфингомиелиназой (ASM, acid sphingomyelinase).

#### 10 2. Описание уровня техники

Метаболизм сфинголипидов регулирует нормальную передачу клеточных сигналов, а аномальные изменения метаболизма сфинголипидов вызывают различные нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Альцгеймера. Белок кислой сфингомиелиназы (ASM), фермент, регулирующий метаболизм сфинголипидов, представляет собой белок, экспрессируемый почти во всех типах клеток и играющий важную роль в метаболизме сфинголипидов и обновлении клеточных мембран.

В головном мозге пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, активность белка ASM значительно повышена по сравнению с таковой у здоровых людей. В связи с этим в корейском патенте № 10-1521117 раскрыто, что ингибирование активности сверхэкспрессированного белка ASM или ингибирование экспрессии белка ASM подавляет накопление  $\beta$ -амилоида и

улучшает способность к обучению и память и, таким образом, может лечить нейродегенеративные заболевания. Недавно стало известно, что активность белка ASM также повышается при неврологических заболеваниях, таких как депрессия, и, таким образом, ингибирование экспрессии или активности белка ASM эффективно для уменьшения выраженности депрессии.

Однако вещества, которые непосредственно ингибируют экспрессию или активность белка ASM, не были разработаны, и было обнаружено несколько типов ингибиторов, которые косвенно ингибируют экспрессию белка ASM. Например, существуют трициклические антидепрессанты, применяемые при лечении депрессии, и их примеры включают amitriptyline, desipramine, nortriptyline и тому подобные. Несмотря на то, что эти трициклические антидепрессанты не были разработаны в качестве ингибиторов белка ASM, различные исследования показали, что такие антидепрессанты проявляют ингибирующее действие на белок ASM. Основным фармакологическим механизмом трициклических антидепрессантов является то, что их активность повышается за счет ингибирования обратного захвата нейротрансмиттеров в нервных клетках, и было подтверждено, что их действие в качестве ингибитора ASM является второстепенным. Однако трициклические антидепрессанты могут действовать на нервную систему и нервные клетки, вызывая побочные эффекты, такие как ухудшение зрения, повышенная светочувствительность и рвота.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в одном из аспектов настоящего  
5 изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий  
фрагмент, которые специфично связываются с белком ASM.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен  
способ получения антитела или его антигенсвязывающего  
фрагмента.

10 В ещё одном аспекте настоящего изобретения предложено  
применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для  
выявления белка ASM.

В соответствии с аспектами в настоящем изобретении  
15 предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,  
которые специфично связываются с белком кислой  
сфингомиелиназы (ASM).

Кроме того, в настоящем изобретении предложена  
нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело или его  
20 антигенсвязывающий фрагмент.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен  
экспрессионный вектор, содержащий указанную нуклеиновую  
кислоту.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена клетка-  
25 хозяин, содержащая указанную нуклеиновую кислоту или

указанный экспрессионный вектор.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком ASM, указанный способ  
5 включает культивирование клетки-хозяина для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены композиция и набор для выявления белка ASM, каждый из которых содержит указанное антитело или его антигенсвязывающий  
10 фрагмент.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ выявления белка ASM, указанный способ включает обеспечение взаимодействия образца с антителом или его антигенсвязывающим  
фрагментом.

15

Указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, специфично связываются с белком ASM с высокой аффинностью и, таким образом, могут быть эффективно использованы для выявления белка ASM или  
20 диагностики заболевания, возникающего вследствие сверхэкспрессии белка ASM.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

25 На Фиг. 1 показана схематическая диаграмма,

демонстрирующая аминокислотные последовательности  
вариабельных областей тяжёлой и лёгкой цепей антител,  
полученных в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 2 показан график, иллюстрирующий связывание  
5 антител, полученных в соответствии с примером настоящего  
изобретения, с белком ASM, что подтверждено анализом ELISA  
(ИФА).

На Фиг. 3 показано схематическое изображение,  
демонстрирующее антигенсвязывающие сайты антител,  
10 полученных в соответствии с примером настоящего изобретения,  
взаимодействующие с белком ASM, на структурной модели белка  
ASM.

На Фиг. 4 показана тепловая карта водородно-  
дейтериевого обмена в сапозин-домене белка ASM для каждого  
15 из антител, полученных в соответствии с примером настоящего  
изобретения.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

В настоящем изобретении предложено антитело или его  
антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются  
с белком кислой сфингомиелиназы (ASM).

Как описано в настоящей заявке, термин «белок кислой  
25 сфингомиелиназы (ASM)» относится к ферменту, который является

членом семейства сфингомиелиназ (SMase), регулирующих метаболизм сфинголипидов. Белок ASM катализирует разложение сфингомиелина на церамид и фосфатидилхолин и может быть классифицирован как щелочная, нейтральная или кислая сфингомиелиназа в зависимости от pH, при котором проявляется его оптимальная ферментативная активность.

Белок ASM может включать любой тип белка ASM, который известен в данной области техники. В частности, белок ASM может быть получен из млекопитающего, более конкретно, человека, обезьяны, крысы или мыши. Кроме того, белок ASM может содержать все аминокислотные последовательности, известные для белка ASM в данной области техники. Например, белок ASM может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 66 и 67, соответственно, или нуклеиновую кислоту, кодирующую их.

Белок ASM может быть таким, который имеет вставку, делецию или замену по меньшей мере одной аминокислоты в аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 66 или 67, при условии, что он сохраняет биологическую активность, эквивалентную активности белка ASM или соотносимую с ней. Замена аминокислоты может представлять собой консервативную замену, выполняемую в пределах, в которых замена не влияет или оказывает слабое влияние на весь белковый заряд, то есть полярность или гидрофобность. Белок

ASM также может иметь по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99%, гомологии с аминокислотными последовательностями, приведёнными в SEQ ID NO: 66 и 67, соответственно. Белок ASM  
5 может содержать только его часть, при условии, что эта часть сохраняет биологическую активность, эквивалентную активности белка ASM или соотносимую с ней.

Как описано в настоящей заявке, термин «антитело» относится к белку иммунной системы, который связывается с  
10 антигеном, чтобы препятствовать действию антигена или элиминировать антиген. Антитело может включать все типы антител, известные в данной области техники. В частности, антитело может включать иммуноглобулины IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, которые могут содержать тяжёлые цепи, синтезирующиеся с  
15 генов  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  и  $\epsilon$ , кодирующих константные области тяжёлых цепей, соответственно. В технологии антител, как правило, применяют иммуноглобулин IgG. IgG может включать изотипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые могут различаться с точки зрения структурных и функциональных характеристик. Антитело  
20 может включать полностью гуманизированное антитело, содержащее минимальную последовательность, полученную из антитела нечеловеческого происхождения, человеческое антитело, содержащее последовательность человеческого происхождения, или химерное антитело, содержащее смешанные  
25 последовательности, полученные от разных видов.



IgG может иметь очень стабильную Y-образную структуру (молекулярной массой приблизительно 150 кДа), состоящую из двух белков тяжёлых цепей с молекулярной массой приблизительно 50 кДа и двух белков лёгкой цепи с молекулярной массой приблизительно 25 кДа. Тяжёлые и лёгкие цепи, составляющие антитела, могут быть разделены на переменные области, имеющие аминокислотные последовательности, различные для разных антител, и константные области, имеющие аминокислотные последовательности, одинаковые для разных антител. Константные области тяжёлой цепи включают домен CH1, шарнирную область (H), домены CH2 и CH3; каждый из доменов состоит из двух  $\beta$ -слоёв, которые могут быть соединены внутрицепочечной дисульфидной связью. Кроме того, константные области лёгкой цепи могут включать домен CL. Две переменные области тяжёлой цепи и лёгкой цепи объединены с образованием антигенсвязывающего участка, и по одному антигенсвязывающему участку может присутствовать в каждом из двух «плеч» Y-образной структуры. В полноразмерном антителе область, которая может связываться с антигеном, называется антигенсвязывающим фрагментом (Fab, antibody binding fragment), а область, которая не может связываться с антигеном, называется кристаллизуемым фрагментом (Fc, crystallizable fragment), и фрагменты Fab и Fc могут быть соединены шарнирной областью. В варианте осуществления

настоящего изобретения иммуноглобулин IgG может представлять собой IgG мышиноного происхождения и, в частности, может включать константную область тяжёлой цепи иммуноглобулина IgG мыши, состоящую из аминокислотной последовательности, 5 приведённой в SEQ ID NO: 74, и константную область лёгкой цепи  $\lambda$  иммуноглобулина мыши, состоящую из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 76. В альтернативном варианте иммуноглобулин IgG мышиноного происхождения может включать константную область тяжёлой цепи 10 IgG мыши, соответствующую нуклеотидной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 75, и константную область лёгкой цепи  $\lambda$  иммуноглобулина мыши, соответствующую нуклеотидной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 77.

Антитело согласно настоящему изобретению может включать 15 не только полноразмерное антитело, но и его антигенсвязывающий фрагмент. В частности, антигенсвязывающий фрагмент может относиться к области за исключением фрагмента Fc, чьи функции состоят в передаче сигнала о связывании с антигеном на клетку, систему 20 комплемента и тому подобное. Например, антигенсвязывающий фрагмент антитела может включать все виды таких фрагментов, Fab, scFv (вариабельные фрагменты антитела, соединенные в одну цепь), F(ab)2 (двухвалентный антигенсвязывающий фрагмент) и Fv (вариабельные домены VL и VH тяжёлой и лёгкой 25 цепей из одного плеча антитела), а также может включать

фрагмент антитела 3-го поколения, такой как однодоменное антитело и миниантитело.

В аспекте настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться по меньшей мере с одним эпитопом, выбранным из группы, состоящей из

5 фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 53 по 72, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 101 по 123, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 135 по 159, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с

10 135 по 155, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 218 по 228, и фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 259 по 269 от N-конца белка ASM. Белок ASM может иметь признаки, описанные выше. В варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент, включающий

15 аминокислоты в положениях с 53 по 72 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 68 (TAINLGLKKEPNVARVGSVA); фрагмент, включающий аминокислоты в положениях с 101 по 123 от N-конца белка ASM, может

20 представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 69 (VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH); фрагмент, включающий аминокислоты в положениях с 135 по 159 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной

25 последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 70

(PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF); фрагмент, включающий аминокислоты в положениях с 135 по 155 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 5 71 (PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS); фрагмент, включающий аминокислоты в положениях с 218 по 228 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 72 (SGLGPAGPFDM); и фрагмент, включающий аминокислоты в 10 положениях с 259 по 269 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 73 (VRKFLGPVPVY). То есть, согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться 15 по меньшей мере с одним эпитопом, выбранным из группы, состоящей из полипептидов, приведённых в последовательностях SEQ ID NO: 68-73, соответственно.

Используемый в настоящей заявке термин «эпитоп» относится к специфическому участку антигена, который может 20 быть распознан антителом, и означает антигенную детерминанту, с которой антитело может специфично связываться. Термин «эпитоп» обычно используется в том же значении, что и детерминанта, или антигенная детерминанта. Эпитоп состоит из химически активных поверхностных групп молекул, таких как 25 аминокислоты или боковые цепи сахара, и обычно имеет

специфические трёхмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда.

В аспекте настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать: переменную область тяжёлой цепи, содержащую участок CDR1 (complementarity-determining region 1; участок 1, определяющий комплементарность антигена и антитела) тяжёлой цепи (X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MS), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 61, участок CDR2 тяжёлой цепи (X<sub>3</sub>IX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>YYADSVKG), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 62, и участок CDR3 тяжёлой цепи, выбранный из группы, содержащей участки CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 27, 30, 33, 36, 39 и 42; и переменную область лёгкой цепи, содержащую участок CDR1 лёгкой цепи (X<sub>11</sub>GSSSNIGX<sub>12</sub>NX<sub>13</sub>VX<sub>14</sub>), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 63, участок CDR2 лёгкой цепи (X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>RPS), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 64, и участок CDR3 лёгкой цепи (X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>WDX<sub>21</sub>SLX<sub>22</sub>X<sub>23</sub>YV), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 65.

Термин «участок, определяющий комплементарность (CDR)» относится к гиперпеременной области, который находится в переменных областях тяжёлой цепи и лёгкой цепи антитела,

имеет различную аминокислотную последовательность для каждого антитела и означает участок, который фактически связывается с антигеном. В трёхмерной конформации антитела участок CDR имеет форму петли на поверхности антитела, причём

5 под петлёй может существовать каркасный участок (FR, framework) для структурной поддержки участка CDR. Существует три петлевые структуры в каждой тяжёлой цепи и каждой лёгкой цепи, и эти шесть петлевых структур могут быть объединены вместе для непосредственного контакта с антигеном.

10 Антигенсвязывающий участок, имеющий шесть петлевых структур, участков CDR, условно, может представлять собой участок CDR1 тяжёлой цепи, участок CDR2 тяжёлой цепи, участок CDR3 тяжёлой цепи, участок CDR1 лёгкой цепи, участок CDR2 лёгкой цепи, или участок CDR3 лёгкой цепи.

15 Например, в участке CDR1 тяжёлой цепи ( $X_1YX_2MS$ ), состоящем из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 61, каждая из аминокислот  $X_1$  и  $X_2$  может быть выбрана из кислых и нейтральных аминокислот. В частности,  $X_1$  может представлять собой кислую или нейтральную

20 аминокислоту, и  $X_2$  может представлять собой нейтральную аминокислоту. Например, каждая из аминокислот  $X_1$  и  $X_2$  может быть выбрана из группы, состоящей из аспарагина (Asn), глицина (Gly), серина (Ser), аспарагиновой кислоты (Asp), аланина (Ala) и тирозина (Tyr). В частности,  $X_1$  может

25 представлять собой аспарагин, глицин, серин или аспарагиновую

кислоту, а X<sub>2</sub> может представлять собой аланин или тирозин. В варианте осуществления настоящего изобретения участок CDR1 тяжёлой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 25, 28, 31, 34, 5 37 или 40.

В участке CDR2 тяжёлой цепи (X<sub>3</sub>IX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>YYADSVKG), состоящем из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 62, каждая из аминокислот X<sub>3</sub>-X<sub>10</sub> может быть выбрана из нейтральных и основных аминокислот. В частности, 10 каждая из аминокислот X<sub>3</sub> и X<sub>4</sub>-X<sub>9</sub> может представлять собой нейтральную аминокислоту, и X<sub>10</sub> может представлять собой нейтральную или основную аминокислоту. Например, каждая из аминокислот X<sub>3</sub>-X<sub>10</sub> может быть выбрана из группы, состоящей из глицина, лейцина (Leu), аланина, серина, тирозина, пролина 15 (Pro), аспарагина, лизина (Lys) и изолейцина (Ile). В частности, X<sub>3</sub> может представлять собой глицин, лейцин, аланин или серин; X<sub>4</sub> может представлять собой тирозин или серин; X<sub>5</sub> может представлять собой пролин или тирозин; X<sub>6</sub> может представлять собой аспарагин или глицин; X<sub>7</sub> и X<sub>8</sub> каждая может 20 представлять собой глицин или серин; X<sub>9</sub> может представлять собой аспарагин или серин; и X<sub>10</sub> может представлять собой лизин или изолейцин. В варианте осуществления настоящего изобретения участок CDR2 тяжёлой цепи может состоять из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25 26, 29, 32, 35, 38 или 41.

В участке CDR1 лёгкой цепи ( $X_{11}GSSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$ ),  
состоящем из аминокислотной последовательности, приведённой  
в SEQ ID NO: 63, каждая из аминокислот  $X_{11}$ - $X_{14}$  может быть  
выбрана из нейтральных аминокислот. Например, каждая из  
5 аминокислот  $X_{11}$ - $X_{14}$  может быть выбрана из группы, состоящей из  
треонина (Thr), серина, аспарагина, аланина, пролина и  
тирозина. В частности,  $X_{11}$  может представлять собой треонин  
или серин;  $X_{12}$  может представлять собой аспарагин или серин;  
 $X_{13}$  может представлять собой аланин, пролин, треонин или  
10 тирозин; и  $X_{14}$  может представлять собой аспарагин, тирозин  
или серин. В варианте осуществления настоящего изобретения  
участок CDR1 лёгкой цепи может состоять из аминокислотных  
последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 46, 49, 52,  
55 или 58.

15 В участке CDR2 лёгкой цепи ( $X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$ ), состоящем из  
аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO:  
64, каждая из аминокислот  $X_{15}$ - $X_{18}$  может быть выбрана из кислых,  
нейтральных и основных аминокислот. В частности, каждая из  
аминокислот  $X_{15}$  и  $X_{16}$  может представлять собой кислую или  
20 нейтральную аминокислоту, и  $X_{17}$  может представлять собой  
нейтральную аминокислоту, и  $X_{18}$  может представлять собой  
основную или нейтральную аминокислоту. Например, каждая из  
аминокислот  $X_{15}$ - $X_{18}$  может быть выбрана из группы, состоящей из  
тирозина, аланина, аспарагиновой кислоты, серина,  
25 аспарагина, гистидина (His), глутамина (Gln) и лизина. В



частности, X<sub>15</sub> может представлять собой тирозин, аланин, аспарагиновую кислоту или серин; X<sub>16</sub> может представлять собой аспарагиновую кислоту или аспарагин; X<sub>17</sub> может представлять собой серин или аспарагин; и X<sub>18</sub> может представлять собой гистидин, глутамин или лизин. В варианте осуществления настоящего изобретения участок CDR2 лёгкой цепи может состоять из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 44, 47, 50, 53, 56 или 59.

В участке CDR3 лёгкой цепи (X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>WDX<sub>21</sub>SLX<sub>22</sub>X<sub>23</sub>YV), состоящем из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 65, каждая из аминокислот X<sub>19</sub>-X<sub>23</sub> может быть выбрана из нейтральных аминокислот. Например, каждая из аминокислот X<sub>19</sub>-X<sub>23</sub> может быть выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, треонина, тирозина, аспарагиновой кислоты и аспарагина. В частности, X<sub>19</sub> может представлять собой глицин или аланин; X<sub>20</sub> может представлять собой аланин, серин или треонин; X<sub>21</sub> может представлять собой тирозин, серин, аланин или аспарагиновую кислоту; X<sub>22</sub> может представлять собой серин или аспарагин; и X<sub>23</sub> может представлять собой аланин или глицин. В варианте осуществления настоящего изобретения участок CDR3 лёгкой цепи может состоять из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 45, 48, 51, 54, 57 или 60.

В другом аспекте настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать: переменную

область тяжёлой цепи, включая участок CDR1 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 28, 31, 34, 37 и 40, соответственно, участок CDR2 тяжёлой цепи, выбранный  
5 из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 26, 29, 32, 35, 38 и 41, соответственно, и участок CDR3 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 27, 30, 33, 36, 39 и 42,  
10 соответственно; и переменную область лёгкой цепи, включая участок CDR1 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 46, 49, 52, 55 и 58, соответственно, участок CDR2 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных  
15 последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 44, 47, 50, 53, 56 и 59, соответственно, и участок CDR3 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 45, 48, 51, 54, 57 и 60, соответственно.

20 Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать: переменную область тяжёлой цепи, выбранную из группы, состоящей из переменной области тяжёлой цепи, включающей участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей,  
25 приведённых в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно,

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно, вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно, вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, и вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно; и вариабельную область лёгкой цепи, выбранную из группы, состоящей из вариабельной области лёгкой цепи, содержащей участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, вариабельную область лёгкой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, вариабельную область лёгкой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой

цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно, переменную область лёгкой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно, переменную область лёгкой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, содержащую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 58, 59 и 60, соответственно.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать: переменную область тяжёлой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно; переменную область тяжёлой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие

из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно; переменную область тяжёлой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно; переменную область тяжёлой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно; переменную область тяжёлой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57, соответственно; или переменную область тяжёлой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно, и

вариабельную область лёгкой цепи, включающую участки CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 58, 59 и 60, соответственно.

5 Например, вариабельная область тяжёлой цепи может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 или 11, а вариабельная область лёгкой цепи может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной  
10 последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 или 23.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно модифицировать по мере необходимости. В частности, указанное  
15 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно модифицировать путём конъюгации, гликозилирования, мечения или их комбинации. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть модифицированы пероксидазой хрена (HRP), щелочной фосфатазой, гаптенном,  
20 биотином, стрептавидином, флуоресцентным веществом, радиоактивным веществом, квантовой точкой, полиэтиленгликолем (ПЭГ), гистидиновой меткой или тому подобным. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также можно конъюгировать с другим лекарственным средством по мере  
25 необходимости.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены в соответствии со способом получения моноклонального антитела, известным в данной области техники, и способ получения может быть соответствующим образом модифицирован специалистом в данной области техники. Например, антитело может быть произведено путём получения гибридом с использованием В-лимфоцитов, полученных из животного, иммунизированного антигеном, или может быть получено с использованием технологии фагового дисплея.

10

Кроме того, в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые нуклеиновой кислотой согласно настоящему изобретению, могут иметь признаки, описанные выше. Так как аминокислотная последовательность, составляющая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, известна, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей её, также будет ясна специалисту в данной области техники. Последовательность нуклеиновой кислоты может иметь по меньшей мере одну вставку, делецию или замену нуклеотидов при условии сохранения активности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, транслированного из нее.

25 Например, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную

область тяжёлой цепи, включенную в антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, может представлять собой полинуклеотид, состоящий из нуклеотидной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 или 12; и нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область лёгкой цепи, включенную в него, может представлять собой полинуклеотид, состоящий из нуклеотидной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22 или 24.

10

Кроме того, в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии (экспрессионный вектор), содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

15 Указанная нуклеиновая кислота, включенная в указанный вектор экспрессии, согласно настоящему изобретению, может кодировать указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие признаки, описанные выше.

В данном контексте термин «вектор экспрессии» представляет собой средство для экспрессии гена-мишени в клетке-хозяине и может включать все подобные средства: плазмидный вектор, космидный вектор, вектор-бактериофаг, вирусный вектор, и тому подобное. Указанный вектор экспрессии может включать элементы, необходимые для синтеза указанного пептида с указанной нуклеиновой кислоты, включённой в него. В частности, вектор экспрессии может

20

25



включать сигнальную последовательность, точку начала репликации, маркерный ген, промотор, последовательность терминации транскрипции и тому подобное. Указанная нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, может быть функционально связана с указанным промотором.

Например, вектор экспрессии, используемый в прокариотических клетках, может включать промотор для транскрипции, сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и последовательности терминации для транскрипции и трансляции. Указанный вектор экспрессии, используемый в эукариотических клетках, может включать промотор и последовательность полиаденилирования, полученные из млекопитающего или вируса млекопитающего.

Все маркерные гены, известные в данной области техники, могут быть использованы в качестве маркерного гена, включенного в указанный вектор экспрессии, и могут представлять собой, в частности, ген устойчивости к антибиотикам. В частности, указанный ген устойчивости к антибиотикам может представлять собой ген, кодирующий устойчивость к антибиотикам, включая ампициллин, гентамицин, карбенициллин, хлорамфеникол, стрептомицин, канамицин, неомицин, тетрациклин, и тому подобное.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена клетка-

хозяин, содержащая указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор экспрессии.

Указанная нуклеиновая кислота или указанный вектор экспрессии, включенные в клетку-хозяин, согласно настоящему изобретению, может иметь признаки, описанные выше. В качестве примера, указанная нуклеиновая кислота может кодировать указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с белком ASM согласно настоящему изобретению, и указанный вектор экспрессии может включать указанную нуклеиновую кислоту, как описано выше.

Все типы клеток, известные к применению для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов в данной области техники, могут быть использованы в качестве клетки-хозяина. В частности, указанная клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, дрожжи или эукариотическую клетку. Примеры указанных прокариотических клеток могут включать *E. coli*, штаммы рода *Bacillus*, штамм рода *Streptomyces*, штамм рода *Pseudomonas*, штамм рода *Staphylococcus* и тому подобные, а примеры дрожжей могут включать *Saccharomyces cerevisiae* и тому подобные. Пример указанной эукариотической клетки может включать клетки линий COS-7, ВНК, CHO, CHO-K1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, HEK293, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC-12, K-562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, HT1080 и тому

подобные.

Указанная клетка-хозяин может быть трансдуцирована указанной нуклеиновой кислотой или вектором экспрессии, как описано выше, в соответствии со способом, известным в данной области техники. В частности, указанная трансдукция может 5 быть выполнена путём временной трансфекции, микроинъекции, трансдукции, клеточной инфузии, осаждения фосфатом кальция, опосредованной липосомами трансфекции, опосредованной ДЭАЭ-декстраном трансфекции, опосредованной полибреном 10 трансфекции, электропорации, генной пушки или тому подобного. Указанные способы также могут быть соответствующим образом модифицированы специалистом в данной области техники.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ 15 получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфично связывается с белком ASM, указанный способ включает культивирование указанной клетки-хозяина для получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

20 Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, произведённые указанным способом получения согласно настоящему изобретению, могут иметь указанные признаки, описанные выше.

Указанное культивирование клеток может быть выполнено с 25 использованием подходящей культуральной среды в зависимости

от типа клетки-хозяина, используемой для получения, и при необходимости в неё могут быть включены подходящие добавки. Указанное культивирование может быть выполнено в подходящей среде в зависимости от типа клетки-хозяина.

5           Указанный способ получения согласно настоящему изобретению может дополнительно включать выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемого в указанной клетке-хозяине. Указанное выделение может быть выполнено в соответствии со способом, известным в данной

10           области техники, который может быть соответствующим образом модифицирован по мере необходимости специалистом в данной области. Например, указанное выделение может быть осуществлено путём удаления примесей посредством центрифугирования или ультрафильтрации, и может быть

15           осуществлено путём дополнительной очистки полученного продукта с помощью хроматографии или тому подобного метода. Указанная хроматография может включать аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий и тому подобные методы.

20

          Кроме того, в настоящем изобретении предложены композиция и набор для выявления белка ASM, каждый из которых содержит указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

25           Указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

включенные в указанные композицию и набор для выявления белка ASM согласно настоящему изобретению, могут иметь указанные признаки, описанные выше.

Кроме того, указанная композиция может содержать  
5 лиганд, способный специфично связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению. Указанный лиганд может представлять собой конъюгат, меченный детектором, таким как хромогенный фермент, флуоресцентное вещество, радиоизотоп, коллоид или тому  
10 подобное, или лиганд, обработанный стрептавидином или авидином. В дополнение к реагентам, описанным выше, указанная композиция для выявления согласно настоящему изобретению может также включать дистиллированную воду или буферный раствор для поддержания стабильности их структуры.

15 Указанный набор можно связать с твёрдым субстратом для облегчения последующих стадий, таких как промывка указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащегося в нём, или разделение комплекса. В качестве твёрдого субстрата могут применяться синтетическая смола,  
20 нитроцеллюлоза, стеклянная подложка, металлическая подложка, стекловолокно, микросферы или микрогранулы. Кроме того, в качестве синтетической смолы могут применяться сложный полиэфир, поливинилхлорид, полистирол, полипропилен, ПВДФ или нейлон.

25 Указанный набор может быть изготовлен обычным способом

производства, известным специалисту в данной области техники, и может дополнительно включать буферный раствор, стабилизатор, инертный белок и тому подобное.

5 Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ выявления белка ASM, указанный способ включает стадию взаимодействия образца с указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,  
10 используемые в указанном способе выявления белка ASM согласно настоящему изобретению, могут иметь указанные признаки, описанные выше.

Указанный образец может включать все виды образцов, которые используются для выявления белка ASM. Способ  
15 выявления белка-мишени с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, хорошо известен в данной области техники, и указанный способ может быть выполнен специалистом в данной области техники посредством соответствующей модификации по мере необходимости.

20

Далее настоящее изобретение будет подробно описано со ссылкой на следующие примеры. Однако следующие приведённые в качестве примера варианты осуществления предназначены исключительно для иллюстрации настоящего изобретения и не  
25 предназначены для ограничения объёма настоящего изобретения.

Любой вариант осуществления, который имеет по существу ту же структуру, что и техническое решение, описанное в формуле изобретения, и достигает тех же эффектов действия, должен быть включён в технический объём настоящего изобретения.

5

**Пример 1: Получение антител, специфично связывающихся с белком кислой сфингомиелиназы (ASM)**

Антитела, которые специфично связываются с белком ASM человека (SEQ ID NO:66) и белком ASM мышцы (SEQ ID NO: 67),  
10 получали следующим образом.

В частности, рекомбинантные белки ASM человека и мышцы, а также фаговая библиотека синтетических фрагментов scFv человека были использованы для скрининга и отбора фагов с фрагментами scFv, которые специфично связывают белок ASM  
15 человека или белок ASM мышцы, с помощью панорамирования обычным способом. Были проанализированы последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие выбранные фрагменты scFv, и идентифицированы транслируемые из них аминокислотные последовательности. Векторы экспрессии были сконструированы  
20 таким образом, что константная область тяжёлой цепи иммуноглобулина мышцы и константная область лёгкой цепи  $\lambda$  иммуноглобулина мышцы, включающие нуклеотидные последовательности, приведённые в SEQ ID NO: 75 и 77, соответственно, соединены с С-концами переменной области  
25 тяжёлой цепи и переменной области лёгкой цепи каждой из

идентифицированных последовательностей фрагментов scFv. Указанные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот указанных переменных областей тяжелой цепи, составляющих фрагмент scFv, 5 содержащиеся в полученных векторах экспрессии, показаны в Таблице 1, а указанные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот указанных переменных областей легкой цепи, составляющих фрагмент scFv, показаны в Таблице 2.

10

ТАБЛИЦА 1

Антитело №	Последовательность	Порядковый номер последовательности
#9101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAP GKGLEWVSGIYPNGGNKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNAYRFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 1
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAATTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGGATCTATCCTAATGG TGGTAATAAATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCCGGTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAAAATGCTTATCGTTTCGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 2
#9102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYMSWVRQAP GKGLEWVSLISPGSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSWHHFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 3
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCGGTTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATTGATCTCTCCTGGTAG	SEQ ID NO: 4



	TGGTAGTATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAAATCTTGGCATCATTTCGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	
#9104	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSNYMSWVRQAP GKGLEWVSGIYYGSGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTPGFYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 5
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAATTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGGATCTATTATGGTAG TGGTAATATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATACGCTGGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 6
#9108	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSNYMSWVRQAP GKGLEWVSAIYPGGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDV LGLTPKPFYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 7
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAATTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCGATCTATCCTGGTGG TGGTAGTATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATGTTTTGGGTCTGACTCCTAAGCCGTTTCGACT ACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 8
#9113	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSSYYMSWVRQAP GKGLEWVSSISP GGS SIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGASLFDYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 9
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAGTTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCGATCTCCTGGTGG TAGTAGTATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAAAGGGGCGTCTCTGTTCGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 10
#9123	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSDYMSWVRQAP	SEQ ID

	GKGLEWVSAISYGGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGGMCTRRQCYDYGM DVWGQGLV TVSS	NO: 11
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCGATTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCGATCTCTTATGGTGG TGGTAATATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGTTGGTGGTATGTGTACTAGGCGTCAGTGTTATT ATGATTATGGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGTACACTGGTC ACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 12

ТАБЛИЦА 2

Антитело №	Последовательность	SEQ ID NO
#9101	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLP TAPKLLIYADSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLRSEDE ADYYCGSWDYSLNAYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 13
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCAACATCTCTTGTAGTGGCTCTTCATCCAAT ATTGGCAATAATTATGTCTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAACTCCTCATCTATGCTGATAGTAAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCGCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTCTTGGGATTATAGCCTGAATGCT TATGTCTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 14
#9102	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNPVYWYQQLP TAPKLLIYANNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDE ADYYCAAWDSLSLGYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 15
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCAACATCTCTTGTAGTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAATAATCCTGTCTACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAACTCCTCATCTATGCTAATAATCAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGCTGCTTGGGATTCTAGCCTGAGTGGT TATGTCTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 16
#9104	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVNWYQQLP TAPKLLIYYDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDE	SEQ ID NO: 17

	ADYYCGAWDYSLSAYVFGGGTKLTVL	
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTACTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAATAATGCTGTCAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATTATGATAGTCATCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTGCTTGGGATTATAGCCTGAGTGCT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 18
#9108	QSVLTQPPSASGTPGQRVTL SCTGSSSNIGSNTVYWYQQLPG TAPKLLIYANSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDE ADYYCGSWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 19
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCCCTCTCTTGTACTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAGTAATACTGTCTACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGCTAATAGTCAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTTCTTGGGATTATAGCCTGAGTGGT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 20
#9113	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCSGSSSNIGNNAVSWYQQLPG TAPKLLIYSDNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDE ADYYCGTWDASLNAYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 21
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGTGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAATAATGCTGTCTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATTCTGATAATAAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTACTTGGGATGCTAGCCTGAATGCT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 22
#9123	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPG TAPKLLIYDNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDE ADYYCGTWDDSLSGYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 23
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAGTAATACTGTCAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGATAAATAGTAAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAAGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTACTTGGGATGATAGCCTGAGTGGT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 24

В качестве указанного вектора экспрессии использовали вектор экспрессии млекопитающих. Полученными векторами экспрессии трансформировали клеточную линию CHO или HEK293 для получения полноразмерных антител, связывающихся либо с белком ASM человека, либо как с белком ASM человека, так и с белком ASM мыши.

**Пример 2: Идентификация участков, определяющих комплементарность (CDR)**

Указанные определяющие комплементарность участки в полученных фрагментах scFv идентифицировали обычным способом, и полученные в результате последовательности указанных участков CDR указанных переменных областей тяжёлых цепей представлены в Таблице 3, а указанные последовательности участков CDR указанных переменных областей лёгких цепей представлены в Таблице 4.

ТАБЛИЦА 3

Антитело №	CDR	Последовательность	SEQ ID NO
#9101	CDR1	NYAMS	SEQ ID NO: 25
	CDR2	GIYPNGGNKYYADSVKG	SEQ ID NO: 26
	CDR3	NAYRFDY	SEQ ID NO: 27
#9102	CDR1	GYMS	SEQ ID NO: 28
	CDR2	LISPGSGSIYYADSVKG	SEQ ID NO: 29
	CDR3	SWHHFDY	SEQ ID NO: 30
#9104	CDR1	NYMS	SEQ ID NO: 31
	CDR2	GIYYGSGNIYYADSVKG	SEQ ID NO: 32

	CDR3	DTPGFDY	SEQ ID NO: 33
#9108	CDR1	NYAMS	SEQ ID NO: 34
	CDR2	AIYPPGGSSIYYADSVKG	SEQ ID NO: 35
	CDR3	DVLGLTPKPFDY	SEQ ID NO: 36
#9113	CDR1	SYYS	SEQ ID NO: 37
	CDR2	SISPPGGSSIYYADSVKG	SEQ ID NO: 38
	CDR3	GASLFDY	SEQ ID NO: 39
#9123	CDR1	DYAMS	SEQ ID NO: 40
	CDR2	AISYGGGNIYYADSVKG	SEQ ID NO: 41
	CDR3	VGGMCTRRQCYDYGMDV	SEQ ID NO: 42

ТАБЛИЦА 4

Антитело №	CDR	Последовательность	SEQ ID NO
#9101	CDR1	SGSSSNIGNNYVS	SEQ ID NO: 43
	CDR2	ADSKRPS	SEQ ID NO: 44
	CDR3	GSWDYSLNAYV	SEQ ID NO: 45
#9102	CDR1	SGSSSNIGNNPVY	SEQ ID NO: 46
	CDR2	ANNQRPS	SEQ ID NO: 47
	CDR3	AAWSSLSGYV	SEQ ID NO: 48
#9104	CDR1	TGSSSNIGNNAVN	SEQ ID NO: 49
	CDR2	YDSHRPS	SEQ ID NO: 50
	CDR3	GAWDYSLSAYV	SEQ ID NO: 51
#9108	CDR1	TGSSSNIGSNTVY	SEQ ID NO: 52
	CDR2	ANSQRPS	SEQ ID NO: 53
	CDR3	GSWDYSLSGYV	SEQ ID NO: 54
#9113	CDR1	SGSSSNIGNNAVS	SEQ ID NO: 55
	CDR2	SDNKRPS	SEQ ID NO: 56
	CDR3	GTWDASLNAYV	SEQ ID NO: 57
#9123	CDR1	SGSSSNIGSNTVN	SEQ ID NO: 58
	CDR2	DNSKRPS	SEQ ID NO: 59
	CDR3	GTWDDSLSGYV	SEQ ID NO: 60

#### Экспериментальный пример 1: Подтверждение связывания с

#### 5 белком ASM

Связывание с белком ASM полученных антител, специфично связывающихся с белком ASM, анализировали методом ELISA.

Сначала по 100 мкл раствора рекомбинантного белка ASM человека с концентрацией 1 мкг/мл (R&D systems) добавляли в лунки 96-луночного планшета (Thermo Scientific) и оставляли при 4 °С в течение 16 часов для сорбирования планшета белком.

5 Затем в лунки сорбированного планшета добавляли по 200 мкл PBS, содержащего 5% BSA, с последующей инкубацией при 37 °С в течение примерно 2 часов, а затем планшет трижды промывали буферным раствором PBS, содержащим 0,05% Tween 20. В планшет наносили антитела к белку ASM в концентрации 0,0001, 0,001,

10 0,01, 0,1, 1, 10 или 100 нМ, с последующей инкубацией при 37 °С в течение примерно 1 часа. После инкубации планшет трижды промывали буферным раствором PBS, содержащим 0,05% Tween 20, и добавляли по 100 мкл конъюгата с пероксидазой хрена козьих антимышиных антител IgG-HRP (Jackson

15 Immunoresearch) в качестве вторичного антитела. После повторной инкубации при 37 °С в течение примерно 1 часа планшет трижды промывали буферным раствором PBS, содержащим 0,05% Tween 20. Затем в планшет добавляли по 100 мкл субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) с последующей

20 дополнительной инкубацией при комнатной температуре в течение примерно 5 минут, после чего реакцию прекращали с помощью добавления 100 мкл 2-нормального раствора серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Результаты измеренной оптической плотности показаны на Фиг.

25 2, а значения EC<sub>50</sub> (half maximal effective concentration)

антител, рассчитанные по значениям оптической плотности, показаны в Таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

Антитело №	EC <sub>50</sub> (нМ)
#9101	0,0815
#9102	0,0954
#9104	1,948
#9108	0,3269
#9123	0,7578

5

Как показано на Фиг. 2, все пять типов полученных антител, описанных выше, связывались с белком ASM в зависимости от концентрации. В частности, как показано в Таблице 5, антитело #9101 показало самое низкое значение EC<sub>50</sub> и, таким образом, обладало самой высокой способностью связываться с белком ASM.

10

#### **Экспериментальный пример 2: Подтверждение аффинности связывания с белком ASM**

15

Аффинность связывания и интерактивную динамику взаимодействия с белком ASM полученного выше антитела, специфично связывающегося с белком ASM, измеряли с помощью системы анализа межмолекулярных взаимодействий Octet® QK384 (Pall Life® Sciences).

20

Сначала биосенсор AR2G (ForteBio) обрабатывали раствором 20 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид

гидрохлорида (EDC) и 40 мМ N-гидроксисульфосукцинимид (sulfo-NHS) для активации карбоксильных групп. Затем растворы рекомбинантного белка ASM человека в концентрации 10 мкг/мл или рекомбинантного белка ASM мыши в концентрации 2,5 мкг/мл получали путём разведения в 10 мМ растворе ацетата натрия (pH 5,0) (ForteBio). Раствор с разведённым белком ASM добавляли к биосенсору AR2G с активированной карбоксильной группой для получения биосенсора AR2G с иммобилизованным рекомбинантным белком ASM человека или мыши. К биосенсору, на котором иммобилизовали полученный белок ASM, добавляли 1 М этаноламин (ForteBio) для инактивации оставшихся непрореагировавших карбоксильных групп. Антитела, полученные в Примере 1, добавляли к биосенсору в концентрациях 0,4, 2 или 10 нМ, и затем фазу связывания продукта реакции наблюдали в течение примерно 900 секунд. Далее добавляли 1x-кратный буфер для кинетического анализа (ForteBio), и фазу диссоциации продукта реакции наблюдали в течение примерно 1200 секунд. Константу ассоциации (Kon), константу диссоциации (Kdis) и равновесную константу диссоциации (KD) каждого антитела определяли с использованием программного обеспечения для анализа Octet® (Pall Life Sciences). Результаты анализа рекомбинантного белка ASM человека приведены в Таблице 6, а результаты анализа рекомбинантного белка ASM мыши приведены в Таблице 7.

25



ТАБЛИЦА 6

Антитело №	$K_D$ (М)	$K_{on}$ ( $M^{-1} \cdot c^{-1}$ )	$K_{dis}$ ( $c^{-1}$ )	$R_{Max}$	Полный $R^2$
#9101	1.16E-09	6,26E+05	7.28E-04	0,4527	0,9861
#9102	2.52E-10	4,16E+05	1,05E-04	0,8652	0,997
#9104	2,09E-10	3,92E+05	8,18E-05	0,3324	0,9759
#9108	1.19E-10	2,49E+05	2,96E-05	0,45	0,999
#9113	5,64E-10	1,16E+06	6,56E-04	0,2868	0,9635

ТАБЛИЦА 7

Антитело №	$K_D$ (М)	$K_{on}$ ( $M^{-1} \cdot c^{-1}$ )	$K_{dis}$ ( $c^{-1}$ )	$R_{Max}$	Полный $R^2$
#9101	4,25E-11	3,76E+06	1,59E-04	0,0185	0,5527
#9102	4,98E-10	4,89E+05	2,43E-04	0,4281	0,9944
#9104	6,38E-10	3.10E+05	1,98E-04	0,7027	0,9971
#9108	3,39E-09	4,59E+05	1,56E-03	0,3921	0,9865
#9113	<1,0E-12	1,00E+06	<1,0E-07	0	0

5 Как показано в Таблице 6, пять типов антител, полученных в Примере 1, связывались с белком ASM человека с аффинностью связывания от  $10^{-10}$  до  $10^{-9}$  М. Однако только антитела #9102, #9104 и #9108 показали аффинность связывания от  $10^{-10}$  до  $10^{-9}$  М с белком ASM мыши, как показано в Таблице 7.

10

### Экспериментальный пример 3: Идентификация антигенной детерминанты белка ASM

Участки белка ASM, с которыми связывались антитела согласно настоящему изобретению, то есть антигенные 15 детерминанты, исследовали с помощью масс-спектрометрии с использованием водородно-дейтериевого обмена (hydrogen

deuterium exchange mass spectrometry, HDX-MS).

Сначала белок ASM в концентрации 1000 мкг/мл, антитела mIgG1 #9101 в концентрации 1000 мкг/мл, mIgG2 #9102 в концентрации 1250 мкг/мл, mIgG4 #9104 в концентрации 1000 мкг/мл, mIgG1 #9108 в концентрации 1000 мкг/мл, mIgG1 #9113 в концентрации 3300 мкг/мл или mIgG1 #9123 в концентрации 2932 мкг/мл последовательно разводили с использованием двукратных серийных разведений для получения 128-кратного разведения. Затем отбирали 1 мкл каждого из полученных разведений и смешивали с равным количеством синапиновой кислоты с концентрацией 10 мг/мл в качестве матрицы (набор для анализа K200 MALDI, CovalX), и 1 мкл смеси наносили на подложки-мишени SCOUT 384 MALDI с последующей кристаллизацией при комнатной температуре. После этого кристаллы анализировали с использованием масс-спектрометра MALDI. Для получения данных сшивки при анализе нековалентных взаимодействий 1 мкл каждого из 128-кратных разведений смешивали с равным количеством реагента-стабилизатора K200 с концентрацией 2 мг/мл (набор K200 MALDI, CovalX) с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции 1 мкл смешанного раствора подвергали анализу с использованием масс-спектрометра MALDI, и результаты измерений анализировали в режиме высокого разрешения MALDI MS. Результаты анализа пептидных последовательностей участков, которые были идентифицированы

как имеющие значительную разницу во включении дейтерия в белок ASM, показаны в Таблице 8, а модели структуры белка ASM человека, показывающие участки связывания белка ASM с каждым антителом, показаны на Фиг. 3. Тепловая карта дейтериевого обмена для каждого из антител в отношении сапозин-домена белка ASM показана на Фиг. 4.

ТАБЛИЦА 8

Антитело №	Область пептида	Аминокислотная последовательность
#9101	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
#9102	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
	218-228	SGLGPAGPFDM
#9104	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
#9108	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9113	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	101-123	VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9123	259-269	VRKFLGPVPVY

10 Как показано в Таблице 8 и на Фиг.3, антитела согласно настоящему изобретению связывались с аминокислотным фрагментом в положениях с 53 по 72 (SEQ ID NO: 68, TAINLGLKKEPNVARVGSVA), аминокислотным фрагментом в  
15 положениях с 101 по 123 (SEQ ID NO: 69, VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH), аминокислотным фрагментом в положениях с 135 по 159 (SEQ ID NO: 70,

PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF), аминокислотным фрагментом в положениях с 135 по 155 (SEQ ID NO: 71, PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS), аминокислотным фрагментом в положениях с 218 по 228 (SEQ ID NO:72, SGLGPAGPFDM) или  
5 аминокислотным фрагментом в положениях с 259 по 269 (SEQ ID NO: 73, VRKFLGPVPVY) от N-конца белка ASM. В частности, как показано на Фиг. 4, антитела согласно настоящему изобретению в основном связывались с  $\alpha$ -спиралью 1 и  $\alpha$ -спиралью 2 в сапозин-домене.

10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с белком кислой сфингомиелиназы (ASM).

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с одним эпитопом, выбранным из группы, состоящей из фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 53 по 72, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 101 по 123, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях со 135 по 159, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 135 по 155, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 218 по 228, и фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 259 по 269 от N-конца белка ASM.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с одним эпитопом, выбранным из группы, состоящей из полипептидов, приведённых в последовательностях SEQ ID NO: 68-73, соответственно.

25

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1 тяжёлой цепи (X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MS), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 61, CDR2 тяжёлой цепи (X<sub>3</sub>IX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>YYADSVKG), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 62, и CDR3 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 27, 30, 33, 36, 39 и 42; и

вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1 лёгкой цепи (X<sub>11</sub>GSSSNIGX<sub>12</sub>NX<sub>13</sub>VX<sub>14</sub>), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 63, CDR2 лёгкой цепи (X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>RPS), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 64, и CDR3 лёгкой цепи (X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>WDX<sub>21</sub>SLX<sub>22</sub>X<sub>23</sub>YV), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 65.

20

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, отличающиеся тем, что:

каждая из аминокислот X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> выбрана из группы, состоящей из аспарагина (Asn), глицина (Gly), серина (Ser), аспарагиновой кислоты (Asp), аланина (Ala) и тирозина (Tyr);

25

каждая из аминокислот  $X_3$ - $X_{10}$  выбрана из группы, состоящей из глицина, лейцина (Leu), аланина, серина, тирозина, пролина (Pro), аспарагина, лизина (Lys) и изолейцина (Ile);

каждая из аминокислот  $X_{11}$ - $X_{14}$  выбрана из группы, состоящей из треонина (Thr), серина, аспарагина, аланина, пролина и тирозина;

каждая из аминокислот  $X_{15}$ - $X_{18}$  выбрана из группы, состоящей из тирозина, аланина, аспарагиновой кислоты, серина, аспарагина, гистидина (His), глутамина (Gln) и лизина; и

каждая из аминокислот  $X_{19}$ - $X_{23}$  выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, треонина, тирозина, аспарагиновой кислоты и аспарагина.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, отличающиеся тем, что:

$X_1$  представляет собой аспарагин, глицин, серин или аспарагиновую кислоту;

$X_2$  представляет собой аланин или тирозин;

$X_3$  представляет собой глицин, лейцин, аланин или серин;

$X_4$  представляет собой тирозин или серин;

$X_5$  представляет собой пролин или тирозин;

$X_6$  представляет собой аспарагин или глицин;

каждая из аминокислот  $X_7$  и  $X_8$  представляет собой глицин или серин;

- X<sub>9</sub> представляет собой аспарагин или серин;
- X<sub>10</sub> представляет собой лизин или изолейцин;
- X<sub>11</sub> представляет собой треонин или серин;
- X<sub>12</sub> представляет собой аспарагин или серин;
- 5 X<sub>13</sub> представляет собой аланин, пролин, треонин или тирозин;
- X<sub>14</sub> представляет собой аспарагин, тирозин или серин;
- X<sub>15</sub> представляет собой тирозин, аланин, аспарагиновую кислоту или серин;
- 10 X<sub>16</sub> представляет собой аспарагиновую кислоту или аспарагин;
- X<sub>17</sub> представляет собой серин или аспарагин;
- X<sub>18</sub> представляет собой гистидин, глутамин или лизин;
- X<sub>19</sub> представляет собой глицин или аланин;
- 15 X<sub>20</sub> представляет собой аланин, серин или треонин;
- X<sub>21</sub> представляет собой тирозин, серин, аланин или аспарагиновую кислоту;
- X<sub>22</sub> представляет собой серин или аспарагин; и
- X<sub>23</sub> представляет собой аланин или глицин.

20

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую

25 CDR1 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из



аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:  
25, 28, 31, 34, 37 и 40, соответственно,

CDR2 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из  
аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:  
5 26, 29, 32, 35, 38 и 41, соответственно, и

CDR3 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из  
аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:  
27, 30, 33, 36, 39 и 42, соответственно; и

вариабельную область лёгкой цепи, содержащую  
10 CDR1 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из  
аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:  
43, 46, 49, 52, 55 и 58, соответственно,

CDR2 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из  
аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:  
15 44, 47, 50, 53, 56 и 59, соответственно, и

CDR3 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из  
аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:  
45, 48, 51, 54, 57 и 60, соответственно.

20 8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.  
1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его  
антигенсвязывающий фрагмент содержат:

вариабельную область тяжёлой цепи, выбранную из группы,  
состоящей из:

25 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1,

CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно,

5           вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно,

10           вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно,

15           вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно,

            вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, и

20           вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно; и

25           вариабельную область лёгкой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно,

5        вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно,

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2  
10 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно,

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных  
15 последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно,

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57,  
20 соответственно, и

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 58, 59 и 60, соответственно.

25

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно;

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно;

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно;

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1,

CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из  
5 аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно;

переменную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39,  
10 соответственно, и переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57, соответственно; или

переменную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1,  
15 CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:  
20 58, 59 и 60, соответственно.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанный белок ASM происходит от млекопитающего.

25

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанный белок ASM представляет собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 66 или 67.

5

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1.

13. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 12.

10

14. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 12 или вектор экспрессии по п. 13.

15. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком ASM, причём указанный способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 14 с получением указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

20

16. Композиция для выявления белка ASM, причём указанная композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11.

25. Набор для выявления белка ASM, причём указанный

набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11.

18. Способ выявления белка ASM, причём указанный  
5 способ включает обеспечение взаимодействия образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-11.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжёлой цепи

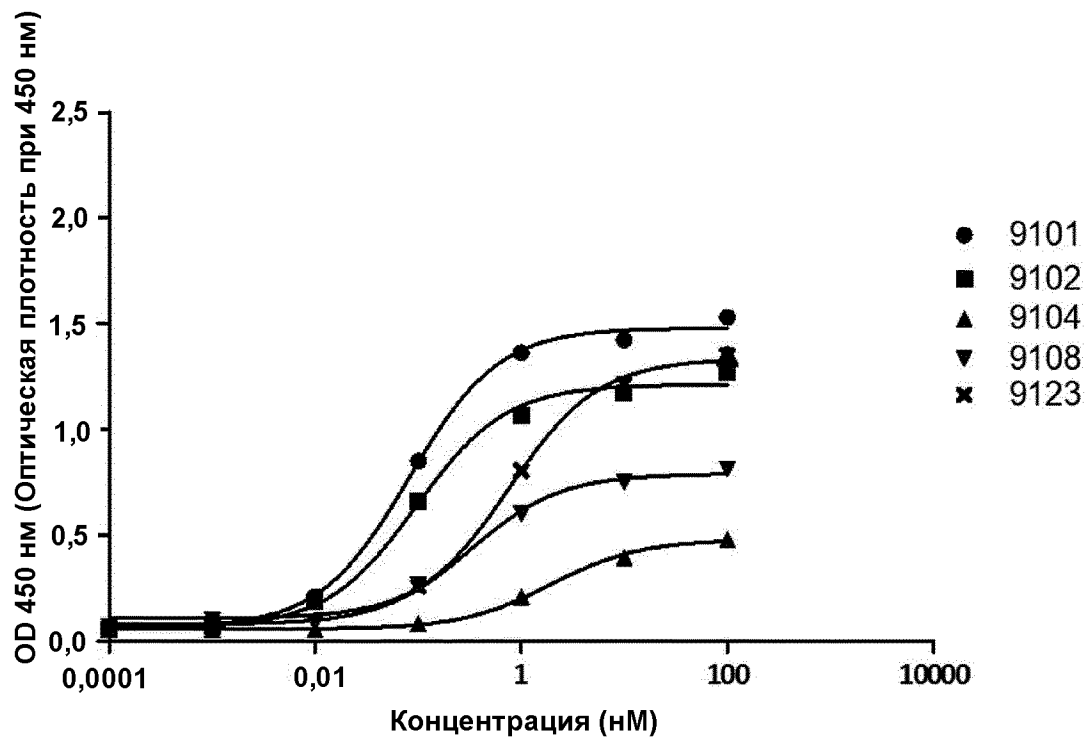
Антитело	CDR1	CDR2
9101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS	WVRQAPGKGLEWVSGIYPNGGNKYADSVKGRF
9102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYS	WVRQAPGKGLEWVSLISPGSGSIYYADSVKGRF
9104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYS	WVRQAPGKGLEWVSGIYYGSGNIYYADSVKGRF
9108	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS	WVRQAPGKGLEWVSAIYPGGGSIYYADSVKGRF
9113	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYS	WVRQAPGKGLEWVSSISPGGSSIYYADSVKGRF
9123	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMS	WVRQAPGKGLEWVSAISYGGGNIYYADSVKGRF
CDR3		
9101	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAYRF	-----DYWGQGT
9102	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWHHF	-----DYWGQGT
9104	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTPGF	-----DYWGQGT
9108	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVLGLTPKPF	-----DYWGQGT
9113	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGASLF	-----DYWGQGT
9123	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGMCTRRQCYDYGM	-----DYWGQGT

Аминокислотная последовательность варибельной области лёгкой цепи

Антитело	CDR1	CDR2
9101	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIYADSKRPSGVPDRFSGSKSG
9102	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGNNPVY	WYQQLPGTAPKLLIYANNORPSGVPDRFSGSKSG
9104	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCTGSSSNIGNNAVN	WYQQLPGTAPKLLIYDSDHRPSGVPDRFSGSKSG
9108	QSVLTQPPSASGTPGQRVTLSCITGSSSNIGSNTVY	WYQQLPGTAPKLLIYANSQRPSGVPDRFSGSKSG
9113	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGNNAVS	WYQQLPGTAPKLLIYSDNKRPSGVPDRFSGSKSG
9123	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIYDNSKRPSGVPDRFSGSKSG
CDR3		
9101	TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDYSLNAYV	FGGGTKLTVL
9102	TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDSSLGYV	FGGGTKLTVL
9104	TSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDYSLSAYV	FGGGTKLTVL
9108	TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDYSLSGYV	FGGGTKLTVL
9113	TSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDASLNAYV	FGGGTKLTVL
9123	TSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDSSLGYV	FGGGTKLTVL



Фиг. 2



Модель структуры белка ASM человека



<p><b>9101</b> #1: 135-159</p>		<p><b>9108</b> #1: 53-72 #2: 135-155 #3: 259-269</p>	
<p><b>9102</b> #1: 135-159 #2: 218-228</p>		<p><b>9113</b> #1: 53-72 #2: 101-123 #3: 135-155 #4: 259-269</p>	
<p><b>9104</b> #1: 53-72 #2: 135-159</p>		<p><b>9123</b> #1: 259-269</p>	

■ Участок прогнозированного эпитопа

Фиг. 3

Фиг. 4

