

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393167** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.10

(54) **АНТИТЕЛА К TMPRSS6 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 63/187,150

(32) 2021.05.11

(33) US

(86) PCT/US2022/028595

(87) WO 2022/240877 2022.11.17

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Чин Харви, Хатселл Сара Дж., Лоб
Хайнрих Эмиль, Мерфи Эндрю Дж.,
Олсон Уильям, Саотоме Кеи, Чжан
Боцзе (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе представлены моноклональные антитела, которые связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), и способы их применения. В различных вариантах осуществления антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с TMPRSS6. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, применимы в способе лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния, ассоциированных с TMPRSS6, у людей.

202393167
A1

202393167

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579769EA/061

АНТИТЕЛА К TMPRSS6 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным № 63/187150, поданной 11 мая 2021 г., полное описание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (имя: 728825_RGN9-002PC_ST25.txt; размер: 141,9 килобайт; дата создания: 10 мая 2022 г.) включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[003] В данном документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6). В данном документе также раскрыты нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют такие антитела, клетки-хозяева, содержащие их, и терапевтические способы применения антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Трансмембранная сериновая протеаза 6 (TMPRSS6; также известная как матриптаза-2 или MTP-2) представляет собой трансмембранную сериновую протеазу типа II, состоящую из короткой N-концевой внутриклеточной области, за которой следуют один трансмембранный домен, один домен SEA, два домена CUB, три домена с повтором LDLRa и C-концевой домен каталитической сериновой протеазы. TMPRSS6 высоко экспрессируется в печени и играет роль в гомеостазе железа посредством отрицательного регулирования экспрессию гепсидина. Высокие уровни гепсидина блокируют экспорт железа из клеток посредством снижения уровня канала оттока железа, ферропортина, с клеточной поверхности. TMPRSS6 расщепляет гемоювелин (HJV), что приводит к снижению передачи сигналов SMAD и последующему подавлению транскрипции *HAMP*, гена, кодирующего гепсидин.

[005] Снижение уровней экспрессии гепсидина может приводить к перегрузке железом или гемохроматозу. Нарушения, связанные с перегрузкой железом, представляют собой группу нарушений, которые приводят к накоплению избытка железа в организме. Поскольку организм не может вывести излишки железа, избыток железа сохраняется в определенных органах, например, в печени, сердце и поджелудочной железе. Избыток железа, которое хранится в таких органах, может приводить к повреждению органов и другим ассоциированным заболеваниям, таким как диабет.

[006] Примеры нарушений, связанных с перегрузкой железом, включают наследственный гемохроматоз (ННС), генетическое нарушение, при котором слишком

много железа из рациона поглощается организмом, и вторичный гемохроматоз, который может возникнуть как осложнение у пациентов с некоторыми гематологическими нарушениями, такими как талассемия (тип наследственной анемии, вызванный снижением продуцирования гемоглобулина) или миелодиспластический синдром (рак крови, который приводит к приобретенной анемии). В случае бета-талассемии и/или миелодиспластического синдрома проведение повторных переливаний крови для лечения анемии, ассоциированной с заболеванием, часто может приводить к перегрузке железом.

[007] Варианты лечения нарушений, связанных с перегрузкой железом, ограничены и обычно требуются на протяжении всей жизни пациента. Варианты лечения включают терапию хелатирования железа, регулярное удаление богатой железом крови с помощью флеботомии или венесекции, а также диетические ограничения для снижения потребления железа. В данной области техники существует потребность в дополнительных и улучшенных композициях и способах лечения нарушений, связанных с перегрузкой железом.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[008] В данном документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают белок трансмембранной сериновой протеазы 6 (TMPRSS6) (т.е. антитела к TMPRSS6). В определенных вариантах осуществления антитела к TMPRSS6 представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с высокой аффинностью с TMPRSS6 человека и ингибируют его протеазную активность.

[009] В одном аспекте в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазы 6 (TMPRSS6), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с каталитическим доменом TMPRSS6, но не связываются с каталитической триадой TMPRSS6.

[010] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно связываются с сайтом, содержащимся в домене 2 LDLRa TMPRSS6. В одном варианте осуществления связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с TMPRSS6 не окклюдирует непосредственно каталитическую триаду TMPRSS6. В других вариантах осуществления связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с TMPRSS6 опосредует аллостерическую регуляцию TMPRSS6. В определенных вариантах осуществления связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с TMPRSS6 опосредует аллостерическое ингибирование TMPRSS6.

[011] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой аллостерический ингибитор TMPRSS6. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий

фрагмент поддерживают TMPRSS6 в неактивной конформации, которая способна связываться с субстратом TMPRSS6, но не расщеплять его. В определенных вариантах осуществления субстрат TMPRSS6 представляет собой гемоювелин (HJV).

[012] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются в каталитическом домене TMPRSS6 в сайте, который стерически окклюдирует каталитическую триаду TMPRSS6. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с гемоювелином (HJV) за связывание с TMPRSS6.

[013] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 человека (hTMPRSS6) (SEQ ID NO:126), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с одной или более аминокислотами, содержащимися во внеклеточном домене hTMPRSS6, как определено с помощью обмена водорода/дейтерия.

[014] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) аминокислот 125-133 SEQ ID NO: 126; (b) аминокислот 586-594 SEQ ID NO: 126; (c) аминокислот 626-650 SEQ ID NO: 126; (d) аминокислот 693-703 SEQ ID NO: 126; (e) аминокислот 704-724 SEQ ID NO: 126; и/или (e) аминокислот 780-805 SEQ ID NO: 126, как определяется обменом водорода/дейтерия. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) аминокислот 693-703 SEQ ID NO: 126; и/или (b) аминокислот 780-805 SEQ ID NO: 126, как определяется обменом водорода/дейтерия. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) аминокислот 125-133 SEQ ID NO: 126; (b) аминокислот 586-594 SEQ ID NO: 126; (c) аминокислот 626-650 SEQ ID NO: 126; и/или (d) аминокислот 704-724 SEQ ID NO: 126, как определяется с помощью водородно-дейтериевого обмена.

[015] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с остатками G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 и N791 TMPRSS6 человека (SEQ ID NO:126), как определяется с помощью структурного моделирования на основе криоэлектронной микроскопии.

[016] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно взаимодействуют с остатками V490, S501,

T502, C503, I504, S505 и K508 TМPRSS6 человека (SEQ ID NO:126), как определяется с помощью структурного моделирования криоэлектронной микроскопии.

[017] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TМPRSS6), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с остатками R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715 и I716 TМPRSS6 человека, как определяется с помощью структурного моделирования на основе криоэлектронной микроскопии.

[018] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TМPRSS6), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR); и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), где HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности HCDR3, указанной в таблице 1.

[019] В определенных вариантах осуществления последовательность LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности LCDR3, указанной в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, указанные в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанные в таблице 1.

[020] В определенных вариантах осуществления (a) домен HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 24, 34, 44, 64, 84 или 102; (b) домен HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 66, 86 или 104; (c) домен HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, 28, 38, 48, 68, 88 или 106; (d) домен LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12, 52, 72, 92 или 110; (e) домен LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14, 54 или 74; и (f) домен LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 56, 76, 94 или 112.

[021] В определенных вариантах осуществления три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи содержат один из следующих наборов CDR: (a) SEQ ID NO: 4 (HCDR1), SEQ ID NO:6 (HCDR2), SEQ ID NO:8 (HCDR3), SEQ ID NO:12 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:16 (LCDR3); (b) SEQ ID NO: 24 (HCDR1), SEQ ID NO:26 (HCDR2), SEQ ID NO:28 (HCDR3), SEQ ID NO:12 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:16 (LCDR3); (c) SEQ ID NO: 34 (HCDR1), SEQ ID NO:36 (HCDR2), SEQ ID NO:38 (HCDR3), SEQ ID NO:12 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:16

(LCDR3); (d) SEQ ID NO: 44 (HCDR1), SEQ ID NO:46 (HCDR2), SEQ ID NO:48 (HCDR3), SEQ ID NO:52 (LCDR1), SEQ ID NO:54 (LCDR2) и SEQ ID NO:56 (LCDR3); (e) SEQ ID NO: 64 (HCDR1), SEQ ID NO:66 (HCDR2), SEQ ID NO:68 (HCDR3), SEQ ID NO:72 (LCDR1), SEQ ID NO:74 (LCDR2) и SEQ ID NO:76 (LCDR3); (f) SEQ ID NO: 84 (HCDR1), SEQ ID NO:86 (HCDR2), SEQ ID NO:88 (HCDR3), SEQ ID NO:92 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:94 (LCDR3); или (g) SEQ ID NO: 102 (HCDR1), SEQ ID NO:104 (HCDR2), SEQ ID NO:106 (HCDR3), SEQ ID NO:110 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:112 (LCDR3).

[022] В определенных вариантах осуществления три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи содержат следующий набор CDR: SEQ ID NO: 44 (HCDR1), SEQ ID NO:46 (HCDR2), SEQ ID NO:48 (HCDR3), SEQ ID NO:52 (LCDR1), SEQ ID NO:54 (LCDR2) и SEQ ID NO:56 (LCDR3). В других вариантах осуществления три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи содержат следующий набор CDR: SEQ ID NO: 102 (HCDR1), SEQ ID NO:104 (HCDR2), SEQ ID NO:106 (HCDR3), SEQ ID NO:110 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:112 (LCDR3).

[023] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с TMPRSS6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR; где HCVR содержит: (i) аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100; (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100; (iii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100; или (iv) аминокислотную последовательность, содержащую не более 12 аминокислотных замен по отношению к последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100.

[024] В определенных вариантах осуществления LCVR содержит: (a) аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108; (b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108; (c) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108; или (d) аминокислотную последовательность, содержащую не более 10 аминокислотных замен по отношению к последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108.

[025] В определенных вариантах осуществления HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100. В определенных вариантах осуществления LCVR содержит аминокислотную

последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108.

[026] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из SEQ ID NO: 2/10, 22/10, 32/10, 42/50, 62/70, 82/90 или 100/108. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 42/50. В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 100/108.

[027] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено антитело, которое связывается с TMPRSS6, где антитело содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 40, 58, 78, 96 и 114.

[028] В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 60, 80, 98 и 116. В определенных вариантах осуществления антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HC/LC, выбранных из SEQ ID NO: 18/20, 30/20, 40/20, 58/60, 78/80, 96/98 или 114/116. В определенных вариантах осуществления антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HC/LC 58/60. В других вариантах осуществления антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HC/LC 114/116.

[029] В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению имеют одно или более свойств, выбранных из: (a) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) связываются с TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее около 21,2 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связываются с TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C с K_D менее около 25,7 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связываются с TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C с K_D менее около 703 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса; (e) связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 человека с EC_{50} менее около 2,7 нМ; (f) связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 обезьяны, с EC_{50} менее около 3,6 нМ; (g) связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 мыши с EC_{50} менее около 35 нМ; (h) ингибируют протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 человека, например, ингибируют TMPRSS6 человека с процентом ингибирования более около 90%; (i) ингибируют протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 человека, например, ингибируют TMPRSS6 человека и демонстрируют IC_{50} менее около 200 пМ; (j) ингибируют протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 мыши, например, ингибируют TMPRSS6 мыши с процентом

ингибирования более около 42%; (k) ингибируют протеазозависимое высвобождение гемоглобина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 мыши, например, ингибируют TMPRSS6 мыши и демонстрируют IC_{50} менее около 274 пМ; (l) ингибируют TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 65%; (m) ингибируют TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C и демонстрируют IC_{50} менее около 10 нМ; (n) ингибируют TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 66%; (o) ингибируют TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C и демонстрируют IC_{50} менее около 50 нМ; (p) ингибируют TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 58%; (q) ингибируют TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C и демонстрируют IC_{50} менее около 35 нМ; (r) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, снижают уровень сывороточного железа субъекта; (s) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышают уровни сывороточного гепсидина субъекта; (t) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышают уровни зрелых эритроцитов субъекта; (u) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышают уровни зрелых эритроцитов в селезенке и/или костном мозге субъекта; (v) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышают уровень гемоглобина у субъекта; или (w) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, снижают уровни насыщения трансферрина у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

[030] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с TMPRSS6 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, раскрытыми в данном документе.

[031] В другом аспекте в настоящем изобретении представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе.

[032] В другом аспекте в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с TMPRSS6, как раскрыто в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[033] В другом аспекте в настоящем изобретении представлена выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как раскрыто в данном документе.

[034] В другом аспекте в настоящем изобретении представлена выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как раскрыто в данном документе.

[035] В другом аспекте в настоящем изобретении представлен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, раскрытую в данном документе.

[036] В другом аспекте в настоящем изобретении представлен набор векторов,

содержащий первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как раскрыто в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как раскрыто в данном документе.

[037] В другом аспекте в настоящем изобретении представлена клетка-хозяин, содержащая вектор или набор векторов, как раскрыто в данном документе.

[038] В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с TMPRSS6, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, позволяющих продуцировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемых таким образом. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает составление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

[039] В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения, предупреждения или облегчения по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или нарушения, ассоциированных с перегрузкой железом, при этом способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

[040] В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой врожденную дизэритропоэтическую анемию, анемию Даймонда-Блэкфана, альфа-талассемию, бета-талассемию, трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию, миелодиспластический синдром, серповидно-клеточную анемию, истинную полицитемию, наследственный гемохроматоз или хроническую болезнь печени. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой бета-талассемию. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой большую бета-талассемию или промежуточную бета-талассемию. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой миелодиспластический синдром. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой миелодиспластический синдром с кольцевыми сидеробластами. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию вследствие дефицита пируваткиназы или сидеробластную трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой хроническое заболевание печени. В определенных вариантах осуществления заболевание или

нарушение представляет собой связанное с алкоголем хроническое заболевание печени, гепатит С или аутоиммунный гепатит.

[041] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят профилактически или терапевтически субъекту, нуждающемуся в этом. В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутривожно, внутривентриально или внутримышечно.

[042] Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[043] На фиг. 1 представлено графическое изображение плана исследования для исследований принудительного бега у мышей в примере 15.

[044] На фиг. 2 показано влияние обработки REGN7999 на длину пробежки (фигура 2A) и продуцирования лактата на длину пробежки (фигура 2B) у $Hbb^{th3/+}$ мышей. Контрольными животными являются мыши C57BL/6 дикого типа (WT) или $Hbb^{th3/+}$ мыши, обработанные антителом изотипического контроля (REGN1945). Примечание. Все данные фигур представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD); $P < 0,05$ указывает на статистически значимые различия в однофакторном ANOVA и апостериорном тесте множественных сравнений Тьюки.

[045] На фиг. 3 показана длина пробежки мышей C57BL/6 дикого типа (WT), обработанных либо REGN7999, либо антителом изотипического контроля (REGN1945).

[046] На фиг. 4 показаны уровни сывороточного гепсидина (фиг. 4A), сывороточного железа (фиг. 4B) и содержания железа в печени (фиг. 4C) у $Hbb^{th3/+}$ мышей, обработанных в течение 8 недель либо REGN7999, либо Acvr2b(L79D)-Fc. Контрольными животными являются мыши C57BL/6 дикого типа (WT) или $Hbb^{th3/+}$ мыши, обработанные антителом изотипического контроля (REGN1945).

[047] На фиг. 5 показана средняя масса тела (г) мышей WT или $Hbb^{th3/+}$ мышей через 8 недель обработки REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc или антителом изотипического контроля (REGN1945). Мыши WT, обработанные изотипическим контролем: кружки, сплошная линия черного цвета. Мыши $Hbb^{th3/+}$, обработанные изотипическим контролем: квадраты, сплошная линия серого цвета. Мыши $Hbb^{th3/+}$, обработанные REGN7999: треугольники (вверху), пунктирная линия черного цвета. Мыши $Hbb^{th3/+}$, обработанные Acvr2b(L79D)-Fc: треугольники (внизу), пунктирная линия серого цвета.

[048] На фиг. 6 показана средняя масса селезенки (г) мышей WT или $Hbb^{th3/+}$ мышей через 8 недель обработки REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc или антителом изотипического контроля (REGN1945).

[049] На фиг. 7 показано количество зрелых эритроцитов селезенки (% $CD44^{low}Ter119^{+}$ клеток) от мышей WT или $Hbb^{th3/+}$ мышей через 8 недель обработки REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc или антителом изотипического контроля (REGN1945).

[050] На фиг. 8 показано количество ретикулоцитов (% $CD44^{high}Ter119^{+}$ клеток) у мышей WT или $Hbb^{th3/+}$ мышей через 8 недель обработки REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc

или антителом изотипического контроля (REGN1945).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[051] Перед описанием способов настоящего изобретения, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

[052] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в соответствующей области. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании раскрытых вариантов осуществления, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определения

[053] Термин «TMPRSS6», также обозначаемый «матриптаза-2» или «MTP-2», относится к трансмембранной сериновой протеазе 6. TMPRSS6 представляет собой трансмембранную сериновую протеазу II типа, состоящую из короткой N-концевой внутриклеточной области (остатки 1-55 TMPRSS6 человека (SEQ ID NO: 126)), за которой следует один трансмембранный домен (остатки 56-76 SEQ ID NO: 126), одиночный домен SEA (белок спермы морского ежа, энтеропептидаза и агрин) (остатки 84-209 SEQ ID NO: 126), два домена CUB (Cis/Clr, фактор роста эмбриона ежа и костный морфогенный белок (BMP)-1) (остатки 213-336 SEQ ID NO: 126 для домена CUB 1 и остатки 335-452 SEQ ID NO: 126 для домена CUB 2), три домена с повтором LDLRa (рецептор липопротеинов низкой плотности, класс A) (остатки 457-489 SEQ ID NO: 126 для домена 1 LDLRa, остатки 492-526 SEQ ID NO: 126 для домена 2 LDLRa и остатки 530-567 SEQ ID NO: 126 для домена 3 LDLRa) и C-концевой домен каталитической сериновой протеазы (остатки 577-811 SEQ ID NO: 126). Домен каталитической сериновой протеазы содержит каталитическую триаду остатков гистидина (остаток 617 TMPRSS6 человека (SEQ ID NO: 126)), аспартата (остаток 668 SEQ ID NO: 126) и серина (остаток 762 SEQ ID NO: 126) (Lee, *Acta Haematol.* (2009) 122(2-3): 87-96; Ramsay et al., *Front. Biosci.* (2008) 13:569-579). Было показано, что TMPRSS6 играет роль в гомеостазе железа, выступая в качестве отрицательного регулятора образования гепсидина посредством расщепления гемоювелина корцептора BMP (HJV) (Dion et al., *Scientific Reports* (2018) 8:12562). Аминокислотная последовательность полноразмерного белка TMPRSS6 человека (изоформа 2) представлена в качестве примера аминокислотной последовательностью из 811 аминокислот, представленной в UniProtKB/Swiss-Prot под номером доступа Q8IU80, и соответствует номеру доступа в NCBI NP_705837.1 (TMPSS6_HUMAN; SEQ ID NO: 126). Белок TMPRSS6 человека кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты,

представленной эталонной последовательностью в NCBI NM_153609.3 (SEQ ID NO: 127). Аминокислотная последовательность полноразмерного белка TMPRSS6 яванского макака представлена в качестве примера аминокислотной последовательностью, представленной в UniProtKB/Swiss-Prot под номером доступа A0A2K5VAP0 и соответствует номеру доступа в NCBI XP_005567441.1 (A0A2K5VAP0_MACFA; SEQ ID NO: 128). Белок TMPRSS6 яванского макака кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной эталонной последовательностью в NCBI XM_005567384 (SEQ ID NO: 129). Аминокислотная последовательность полноразмерного белка TMPRSS6 мыши представлена в качестве примера аминокислотной последовательностью, представленной в UniProtKB/Swiss-Prot под номером доступа Q9DBI0, и соответствует номеру доступа в NCBI NP_082178.2 (TMPS6_MOUSE; SEQ ID NO: 130). Белок TMPRSS6 мыши кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной эталонной последовательностью в NCBI NM_027902.2 (SEQ ID NO: 131). Термин «TMPRSS6» включает рекомбинантный белок TMPRSS6 или его фрагмент. Термин также охватывает белок TMPRSS6 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1 (например, SEQ ID NO: 117-119).

[054] Термин «около» при использовании по отношению к конкретному указанному числовому значению, означает, что значение может отличаться от указанного значения на не более чем 1%. Например, используемое в данном документе выражение «около 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4... 100,7, 100,8, 100,9).

[055] Термин «антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. «полноразмерных молекул антител»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), с чередованием более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

[056] Также возможна замена одного или более остатков CDR или исключение одной или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых для связывания можно обойтись одной или двумя CDR. Padlan *et al.* (1995, FASEB J. 9:133-139) анализировали области контакта между антителами и их антигенами на основе опубликованных кристаллических структур и пришли к выводу, что только от одной пятой до одной трети остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых одна или две CDR не содержали аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos *et al.* (2002) J Mol Biol 320:415-428).

[057] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются), из областей CDR согласно Kabat, лежащих за пределами CDR согласно Chothia, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или его остаток(ки) исключают, их обычно заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности человеческого антитела или консенсусе таких последовательностей. Положения для замещений в CDR и аминокислоты для замещений можно также выбирать эмпирическим путем. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными.

[058] Полностью человеческие моноклональные антитела к TMPRSS6, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко определить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR подвергают мутации до соответствующего(их) остатка(ов) последовательности зародышевого типа, из которой было получено антитело, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевого типа человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего(их) остатка(ов) зародышевого типа (такие изменения последовательности обозначаются в данном документе совместно как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки каркасной области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L подвергают мутации

обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергают мутации обратно в исходную последовательность зародышевой линии, *например*, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасной области и/или CDR подвергают мутации до соответствующего(их) остатка(-ов) другой последовательности зародышевой линии (*m.e.* последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было изначально получено антитело). Кроме того, антитела, раскрытые в данном документе, могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, *например*, при этом определенные отдельные остатки подвергают мутации в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические биологические свойства, сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

[059] В данном документе также раскрыты полностью человеческие моноклональные антитела к TМPRSS6, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела к TМPRSS6, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе.

[060] Термин «человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело», используемый в данном документе, предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. mAb человека, раскрытые в данном документе, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин «человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело», используемый в

данном документе, не предназначен для включения моноклональных антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты к последовательностям FR человека. Этот термин включает антитела, которые рекомбинантно продуцируются у отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека млекопитающего. Этот термин не предназначен для включения антител, выделенных или полученных у субъекта-человека.

[061] Термин «рекомбинантный», используемый в данном документе, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, созданным, экспрессируемым, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области техники как технология рекомбинантной ДНК, которые включают, например, сплайсинг и трансгенную экспрессию ДНК. Термин относится к антителам, экспрессируемым в отличных от человека млекопитающих (включая отличных от человека трансгенных млекопитающих, например, трансгенных мышей), или в системе экспрессии клеток (например, клеток CHO) или выделенных из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител.

[062] Термин «специфически связывается» или «специфически связывается с» и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, равной по меньшей мере около 1×10^{-8} М или меньше (например, меньшая K_D означает более прочное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описано в данном документе, антитела были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, которые специфически связываются с TMPRSS6. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом TMPRSS6 и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями TMPRSS6, тем не менее, считаются антителами, которые «специфически связываются», как используется в данном документе.

[063] Термин антитело «с высокой аффинностью» относится к тем mAb, которые имеют аффинность связывания с TMPRSS6, выраженную как K_D , по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или определения аффинности в растворе с помощью ELISA.

[064] Термин «медленная скорость диссоциации», «Koff» или «kd» означает антитело, которое диссоциирует от TMPRSS6, с константой скорости 1×10^{-3} с⁻¹ или меньше, предпочтительно 1×10^{-4} с⁻¹ или меньше, что определяется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

[065] Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий

фрагмент» антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемые в данном документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с белком TMPRSS6.

[066] В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд или терапевтический фрагмент («иммуноконъюгат»), вторым антителом к TMPRSS6 или любым другим терапевтическим фрагментом, применимым для лечения TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения.

[067] Термин «выделенное антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения антитела, которое по сути не содержит других антител (Ab), имеющих различные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывает TMPRSS6 или его фрагмент, по сути не содержит антител, которые специфически связывают антигены, кроме TMPRSS6).

[068] Термин «поверхностный плазмонный резонанс», используемый в данном документе, относится к оптическому явлению, которое позволяет проводить анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени путем обнаружения изменений в концентрациях белка в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[069] Термин « K_D », используемый в данном документе, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[070] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к участку антигена, на который отвечают В- и/или Т-клетки. Это также относится к области антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подмножество структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут содержать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические трехмерные

структурные характеристики и/или удельные характеристики заряда.

[071] В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, содержат эпитоп или часть эпитопа, содержащие G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 и N791 TМPRSS6 человека (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126). В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, содержат эпитоп или часть эпитопа, содержащие V490, S501, T502, C503, I504, S505 и K508 TМPRSS6 человека (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126). В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, содержат эпитоп, содержащий две части TМPRSS6 человека, при этом первая часть содержит G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 и N791 TМPRSS6 человека, и вторая часть содержит V490, S501, T502, C503, I504, S505 и K508 TМPRSS6 человека (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126).

[072] В других вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, содержат эпитоп или часть эпитопа, содержащие R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715 и I716 TМPRSS6 человека (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126).

[073] Термин «перекрестно конкурирует», используемый в данном документе, означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с антигеном и ингибируют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Этот термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е. первое антитело, которое связывает и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы первое и второе антитела могут связываться с разными, но перекрывающимися эпитопами, так что связывание одного из них ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерического затруднения. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники, например, с помощью интерферометрического анализа биослоя без меток в режиме реального времени. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может выражаться как связывание второго антитела, которое меньше фонового сигнала вследствие самосвязывания (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело). Перекрестная конкуренция между 2 антителами может быть выражена, например, как % связывания второго антитела, который меньше исходного уровня связывания с собственным фоном (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело).

[074] Термин «существенная идентичность» или «по сути идентичный», при обозначении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) имеет место

идентичность нуклеотидной последовательности в по меньшей мере около 90%, и более предпочтительно в по меньшей мере около 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных основаниях, как измеряется с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в определенных случаях, кодировать полипептид, имеющий ту же или по сути сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[075] Применительно к полипептидам термин «существенное сходство» или «существенно сходный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за гэп по умолчанию, имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичности последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства могут быть скорректированы в сторону увеличения для внесения поправки на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) боковые цепи, содержащие амид: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспарат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспарат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытое в публикации Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, которая включена в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативное» замещение представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[076] Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя меры сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с использованием FASTA с рекомендованными параметрами или по умолчанию; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями (Pearson (2000) *выше*). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[077] Под фразой «терапевтически эффективное количество» подразумевается количество, которое вызывает требуемый эффект, по поводу которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в данной области техники с использованием известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[078] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в облегчении симптомов, предупреждении и/или лечении TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения, такого как бета-талассемия или миелодиспластический синдром. Этот термин включает субъектов-людей, которые имеют такое заболевание или нарушение или имеют риск его возникновения.

[079] В настоящем документе термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» относятся к уменьшению или ослаблению симптомов тяжести по меньшей мере одного симптома или признака TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения вследствие введения терапевтического средства, такого как антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. Эти термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптома/признака. Эти термины также включают положительный прогноз заболевания, т.е. субъект может не иметь заболевания или может

иметь ослабление симптомов заболевания после введения терапевтического средства, такого как антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

[080] Термины «предупредить», «осуществление предупреждения» или «предупреждение» относятся к ингибированию проявления TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения или любых симптомов или признаков такого заболевания или нарушения после введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в данном документе.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

[081] Если специально не указано иное, термин «антитело», используемый в данном документе, следует понимать как охватывающий молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. «полноразмерные молекулы антитела»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемые в данном документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с белком TMPRSS6. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, фрагмент F(ab')₂, фрагмент F_v, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полноразмерного антитела с помощью любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

[082] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты F_d; (iv) фрагменты F_v; (v) одноцепочечные молекулы F_v (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (*например*, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические

антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетрадела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», используемое в данном документе.

[083] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и, в общем случае, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или более каркасных последовательностей или находится в рамке считывания с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[084] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела, раскрытого в данном документе, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включительно с любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены либо могут быть напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или большего числа) аминокислот, которые приводят к образованию гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанного в данном документе, может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной(ых) связи(ей)).

[085] Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с

другим эпитопом того же антигена. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые в данном документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела, раскрытого в данном документе, с использованием обычных методик, доступных в данной области техники.

Получение человеческих антител

[086] Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны в данной области техники. Любые такие известные способы можно применять в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, специфически связывающихся с TMPRSS6.

[087] Иммуноген, содержащий любой из следующих компонентов, может быть использован для получения антител к белку TMPRSS6. В определенных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным белком TMPRSS6 (см., например, номер доступа Q8IU80 в UniProtKB/Swiss-Prot) или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. В качестве альтернативы белок или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методик, модифицировать и использовать в качестве иммуногена.

[088] В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок TMPRSS6 или его фрагмент, экспрессируемый в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, SEQ ID NO: 117-119).

[089] С использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патент США 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к TMPRSS6, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, имеющей геном, которой содержит переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируется в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[090] Как правило, мышь VELOCIMMUNE® стимулируют антигеном, представляющим интерес, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют у мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы для получения immortalized клеточных линий гибридомы, и такие линии гибридомных клеток подвергаются скринингу и отбору для идентификации

клеточных линий гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с требуемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть продуцирован в клетке, такой как клетка СНО. В качестве альтернативы ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[091] Первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуются и отбираются по требуемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяются требуемой константной областью человека для создания полностью человеческого антитела, как раскрыто в данном документе, например, дикого типа или модифицированные IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокой аффинности связывания с антигеном и специфичности к целевой молекуле находятся в переменной области.

Биоэквиваленты

[092] Антитела к TMPRSS6 и фрагменты антител, раскрытые в данном документе, охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать белок TMPRSS6. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по сути эквивалентна активности описанных антител. Аналогично, последовательности ДНК, кодирующие антитела, раскрытые в данном документе, включают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по сути биоэквивалентны антителу или фрагменту антитела, раскрытого в данном документе.

[093] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не обнаруживают существенной разницы при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, либо однократной дозе, либо многократных дозах. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и тем не менее могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не являются

существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются незначимыми с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

[094] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или эффективности отсутствуют.

[095] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может один или более раз переключаться между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого повышения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

[096] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия в зависимости от состояния или условий применения, в той степени, в которой такие механизмы известны.

[097] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована посредством способов *in vivo* и/или *in vitro*. Показатели биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, при котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости как функция времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировал с данными о биодоступности *in vivo* у людей и позволяет их с достаточной степенью прогнозировать; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

[098] Биоэквивалентные варианты раскрытых антител могут быть сконструированы, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предупреждения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые изменяют характеристики гликозилирования антител, *например*, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Антитела к TMPRSS6, содержащие варианты Fc

[099] Антитела, упомянутые в данном документе, обычно содержат полностью

человеческие переменные области, но могут содержать константные области человека или мыши. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши может быть преобразовано в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблице 1, останутся прежними, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по сути сходными независимо от природы Fc-домена. В определенных вариантах осуществления антитела содержат Fc IgG4 человека. В одном варианте осуществления Fc IgG4 человека содержит мутацию серина на пролин в шарнирной области (S108P) для содействия стабилизации димера.

[0100] В соответствии с определенными вариантами осуществления, раскрытым в данном документе, представлены антитела к TMPRSS6, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые повышают или снижают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к TMPRSS6, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, где мутация(и) повышает(ют) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьируется от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к повышению периода полужизни антитела из сыворотки крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или модификацию 297A (например, N297A).

[0101] Например, настоящее изобретение включает антитела к TMPRSS6, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеуказанных мутаций Fc-

домена и других мутаций в переменных доменах антитела, описанных в данном документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

[0102] В данном документе также раскрыты антитела к TMPRSS6, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела, описанные в данном документе, могут содержать химерную область C_H , содержащую часть или весь домен C_{H2} , полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с частью или всем доменом C_{H3} , полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, раскрытые в данном документе, содержат химерную область C_H , имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность «верхнего шарнира» (аминокислотные остатки из положений 216-227 в соответствии с EU-нумерацией), полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с последовательностью «нижнего шарнира» (аминокислотные остатки из положений 228-236 в соответствии с EU-нумерации), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира IgG1 человека или верхнего шарнира IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H , как описано в данном документе, может, в определенных вариантах осуществления, проявлять модифицированные эффекторные функции Fc без отрицательного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела (см., например, публикацию заявки на патент США 2014/0243504, описание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Биологические характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов

[0103] Как правило, раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты функционируют посредством связывания с белком TMPRSS6 и ингибирования его активности (например, ферментативной активности). В некоторых вариантах осуществления ингибированная активность TMPRSS6 представляет собой протеолитическую активность.

[0104] В данном документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают белок TMPRSS6 (т.е. антитела к TMPRSS6 или их антигенсвязывающие фрагменты). В определенных вариантах осуществления антитело к TMPRSS6 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с каталитическим доменом TMPRSS6. В определенных вариантах осуществления антитело к TMPRSS6 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с каталитическим доменом TMPRSS6, но не связывается с каталитической триадой TMPRSS6. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с сайтом,

расположенным в домене 2 LDLRa TMPRSS6 (например, остатки 492-526 TMPRSS6 человека (SEQ ID NO: 126)). В некоторых вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться или взаимодействовать с более чем одним сайтом TMPRSS6. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с сайтом в каталитическом домене TMPRSS6, могут также связываться с сайтом (например, вторичным сайтом), содержащимся в домене 2 LDLRa TMPRSS6.

[0105] Далее в данном документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают каталитический домен TMPRSS6 (например, остатки 577-811 TMPRSS6 человека (SEQ ID NO: 126)), где связывание непосредственно не окклюдирует каталитическую триаду TMPRSS6. Не ограничиваясь теорией, если связывание антител к TMPRSS6 или их антигенсвязывающих фрагментов не окклюдирует непосредственно каталитическую триаду TMPRSS6, TMPRSS6 может сохранять свою способность связывать субстрат, например, гемоювелин (HJV). Например, в определенных вариантах осуществления антитело к TMPRSS6 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TMPRSS6 и поддерживает TMPRSS6 в неактивной конформации, которая способна связываться с субстратом TMPRSS6, но не расщеплять его. В определенных вариантах осуществления антитело к TMPRSS6 или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с TMPRSS6 и поддерживают TMPRSS6 в неактивной конформации, которая способна связываться с гемоювелином, но не расщеплять его. Такие антитела к TMPRSS6 и их антигенсвязывающие фрагменты могут опосредовать аллостерическую регуляцию TMPRSS6. В определенных вариантах осуществления антитело к TMPRSS6 или его антигенсвязывающий фрагмент опосредуют аллостерическое ингибирование TMPRSS6. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают белок TMPRSS6 человека и являются аллостерическими ингибиторами TMPRSS6.

[0106] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с каталитическим доменом TMPRSS6, где связывание непосредственно блокирует каталитическую триаду TMPRSS6. Не ограничиваясь теорией, окклюзия каталитической триады TMPRSS6 может приводить к стерическому затруднению связывания субстрата (например, гемоювелина) с TMPRSS6.

[0107] В данном документе раскрыты антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают белок TMPRSS6 человека (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее около 25 нМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определяется в примере 3 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают TMPRSS6 человека с K_D менее около 25 нМ, менее около 20 нМ, менее около 15 нМ, менее около 10 нМ, менее около 9 нМ, менее около 8 нМ, менее около 7 нМ, менее около 6 нМ, менее около 5 нМ, менее около 4 нМ, менее около 3 нМ, менее около 2 нМ, менее около 1 нМ, менее около 900 пикомоль (пМ),

менее около 800 пМ, менее около 700 пМ, менее около 600 пМ, менее около 500 пМ, менее около 400 пМ, менее около 300 пМ, менее около 200 пМ или менее около 150 пМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определяется в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают TMPRSS6 человека с K_D в диапазоне от около 128 пМ до около 21,2 нМ.

[0108] В данном документе также раскрыты антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают белок TMPRSS6 яванского макака (например, *Macaca fascicularis*) (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее около 30 нМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определяется в примере 3 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают TMPRSS6 яванского макака с K_D менее около 30 нМ, менее около 25 нМ, менее около 20 нМ, менее около 15 нМ, менее около 10 нМ, менее около 9 нМ, менее около 8 нМ, менее около 7 нМ, менее около 6 нМ, менее около 5 нМ, менее около 4 нМ, менее около 3 нМ, менее около 2 нМ, менее около 1 нМ, менее около 900 пикомоль (пМ), менее около 800 пМ, менее около 700 пМ, менее около 600 пМ, менее около 500 пМ, менее около 400 пМ, менее около 300 пМ, менее около 200 пМ, менее около 150 пМ, менее около 100 пМ или менее около 75 пМ, как измеряется посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определяется в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают TMPRSS6 обезьяны с K_D в диапазоне от около 65 пМ до около 25,7 нМ.

[0109] Также в данном документе раскрыты антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают белок TMPRSS6 мыши (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее около 750 нМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определяется в примере 3 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают TMPRSS6 мыши с K_D менее около 750 нМ, менее около 700 нМ, менее около 650 нМ, менее около 600 нМ, менее около 550 нМ, менее около 500 нМ, менее около 450 нМ, менее около 400 нМ, менее около 350 нМ, менее около 300 нМ, менее около 250 нМ, менее около 200 нМ, менее около 150 нМ, менее около 50 нМ, менее около 1000 пикомоль (пМ), менее около 900 пМ, менее около 800 пМ, менее около 700 пМ, менее около 600 пМ, менее около 500 пМ, менее около 400 пМ, менее около 300 пМ, менее около 200 пМ, менее около 150 пМ или менее около 100 пМ, как измеряется посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определяется в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают TMPRSS6 мыши с K_D в

диапазоне от около 82,9 пМ до около 703 нМ.

[0110] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 человека при EC_{50} менее около 5 нМ, менее около 4 нМ, менее около 3 нМ, менее около 2 нМ, менее около 1 нМ, менее около 900 пМ, менее около 800 пМ или менее около 700 пМ, как измеряется, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 5 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 человека при EC_{50} в диапазоне от около 670 пМ до около 2,7 нМ.

[0111] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 яванского макака при EC_{50} менее около 5 нМ, менее около 4 нМ, менее около 3 нМ, менее около 2 нМ или менее около 1 нМ, как измеряется, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 5 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 яванского макака при EC_{50} в диапазоне от около 940 пМ до около 3,6 нМ.

[0112] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 мыши при EC_{50} менее около 40 нМ, менее около 35 нМ, менее около 30 нМ, менее около 25 нМ, менее около 20 нМ, менее около 15 нМ, менее около 10 нМ, менее около 5 нМ, менее около 4 нМ, менее около 3 нМ, менее около 2 нМ, менее около 1 нМ или менее около 0,9 нМ, как измеряется, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 5 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 мыши при EC_{50} в диапазоне от около 840 пМ до около 35 нМ.

[0113] В одном варианте осуществления в данном документе раскрыто выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с белком TMPRSS6, где антитело или его фрагмент проявляют одну или более из следующих характеристик: (a) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело; (b) связываются с TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее около 21,2 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связываются с TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C с K_D менее около 25,7 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связываются с TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C с K_D менее около 703 нМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса; (e) связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 человека с EC_{50} менее около 2,7 нМ; (f) связываются с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 обезьяны, с EC_{50} менее

около 3,6 нМ; (g) связываются с клетками, экспрессирующими TМPRSS6 мыши с EC₅₀ менее около 35 нМ; (h) содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3, указанных в таблице 1, и/или LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанных в таблице 1; и/или (i) содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности HCVR, указанной в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности LCVR, указанной в таблице 1.

[0114] В данном документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6 и снижают уровни сывороточного железа субъекта, нуждающегося в этом, например, как показано в примерах 10, 11 и 14 в данном документе.

[0115] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6 и повышают уровни сывороточного гепсидина субъекта, нуждающегося в этом, например, как показано в примерах 10, 11 и 14 в данном документе.

[0116] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6 и повышают уровни зрелых эритроцитов у субъекта, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6, повышают уровни зрелых эритроцитов в селезенке и/или костном мозге субъекта, нуждающегося в этом. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6 и снижают уровень ретикулоцитов селезенки у субъекта, нуждающегося в этом. Не ограничиваясь теорией, такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6, улучшают эритропоэз субъекта, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с TМPRSS6 и улучшают эритропоэз у субъекта, нуждающегося в этом, что приводит к снижению потребности во вторичном эритропоэзе в селезенке, например, как показано в примере 12 в данном документе.

[0117] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6 и повышают уровни гемоглобина у субъекта, нуждающегося в этом, например, как показано в примере 13 в данном документе.

[0118] В данном документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TМPRSS6 и снижают уровни насыщения трансферрина у субъекта, нуждающегося в этом, например, как показано в примере 14 в данном документе.

[0119] В данном документе раскрыто выделенное рекомбинантное антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком TMPRSS6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляют одну или более из следующих характеристик при введении субъекту, нуждающемуся в этом: (a) снижают уровень сывороточного железа субъекта; (b) повышают уровни сывороточного гепсидина субъекта; (c) повышает уровни зрелых эритроцитов субъекта; (d) повышает уровни зрелых эритроцитов в селезенке и/или костном мозге субъекта; (e) повышают уровни гемоглобина у субъекта; или (f) снижают уровни насыщения трансферрина у субъекта.

[0120] В данном документе раскрыты антитела к TMPRSS6 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые применимы для снижения уровней сывороточного железа субъекта, нуждающегося в этом. В данном документе также раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно применять для повышения уровней сывороточного гепсидина субъекта, нуждающегося в этом. В данном документе также раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые применимы для повышения уровней зрелых эритроцитов у субъекта, нуждающегося в этом. В данном документе также раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые применимы для повышения уровней зрелых эритроцитов в селезенке и/или костном мозге субъекта, нуждающегося в этом. В данном документе также раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые применимы для повышения уровня гемоглобина у субъекта, нуждающегося в этом. В данном документе также раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые применимы для снижения уровней насыщения трансферрина у субъекта, нуждающегося в этом.

[0121] В данном документе раскрыты антитела к TMPRSS6 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно применять для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, которые ассоциированы с повышенными уровнями сывороточного железа. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, которые ассоциированы со снижением уровней сывороточного гепсидина. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, которые ассоциированы со снижением уровней зрелых эритроцитов. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, которые ассоциированы с повышенным уровнем зрелых эритроцитов в селезенке и/или костном мозге. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, которые ассоциированы со снижением уровней гемоглобина. В определенных вариантах осуществления антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, которые ассоциированы с повышенными уровнями насыщения трансферрина.

[0122] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь одну или более из вышеупомянутых характеристик или любые их комбинации. Другие характеристики раскрытых антител и их антигенсвязывающих фрагментов будут очевидны для специалиста в данной области техники из обзора настоящего изобретения, включая рабочие примеры, приведенные в данном документе.

Ингибирование TMPRSS6

[0123] В данном документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют протеазозависимое высвобождение гомоювелина клеточной поверхности (HJV) в присутствии TMPRSS6 человека, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека, с процентом ингибирования более около 90% (например, более около 89,2%, более около 89,4%, более около 89,6%, более около 89,8%, более около 90%, более около 90,2%, более около 90,4%, более около 90,6%, более около 90,8%), как измеряется, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 6 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют протеазозависимое высвобождение гомоювелина клеточной поверхности (HJV) в присутствии TMPRSS6 человека, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека, демонстрирующие значения IC_{50} в диапазоне от около 70 пМ до около 200 пМ (например, около 69,3 пМ, около 70 пМ, около 80 пМ, около 90 пМ, около 100 пМ, около 110 пМ, около 120 пМ, около 130 пМ, около 140 пМ, около 150 пМ, около 160 пМ, около 170 пМ, около 180 пМ, около 190 пМ, около 202 пМ), как измеряется, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 6 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[0124] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют протеазозависимое высвобождение гомоювелина клеточной поверхности (HJV) в присутствии TMPRSS6 мыши, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 мыши, с процентом ингибирования от около 42% до около 98,5% (например, около 41,6%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99%), как измеряется, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 6 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют протеазозависимое высвобождение гомоювелина клеточной поверхности (HJV) в присутствии TMPRSS6 мыши, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 мыши, демонстрирующие значения IC_{50} в диапазоне от около 82,6 пМ до около 274 пМ

(например, около 81,8 пМ, около 90 пМ, около 100 пМ, около 110 пМ, около 120 пМ, около 130 пМ, около 140 пМ, около 150 пМ, около 160 пМ, около 170 пМ, около 180 пМ, около 190 пМ, около 200 пМ, около 210 пМ, около 220 пМ, около 230 пМ, около 240 пМ, около 250 пМ, около 260 пМ, около 276 пМ), как измеряется, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 6 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[0125] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека с процентом ингибирования от около 65% до около 98% (например, около 64,5%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 98,9%), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа СМ», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека, демонстрирующие значение IC_{50} в диапазоне от около 710 пМ до более чем около 10 нМ (например, около 703 пМ, около 750 пМ, около 800 пМ, около 850 пМ, около 900 пМ, около 950 пМ, около 1 нМ, около 5 нМ, около 10,1 нМ), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа СМ», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[0126] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 обезьяны с процентом ингибирования от около 66% до около 98% (например, около 65,5%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 98,9%), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа СМ», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 обезьяны, демонстрирующие значение IC_{50} в диапазоне от около 740 пМ до более чем около 50 нМ (например, около 733 пМ, около 750 пМ, около 800 пМ, около 850 пМ, около 900 пМ, около 950 пМ, около 1 нМ, около 10 нМ, около 15 нМ, около 20 нМ, около 25 нМ, около 30 нМ, около 35 нМ, около 40 нМ, около 45 нМ, около 50,5 нМ), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа СМ», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[0127] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека (например, при 25°C или при 37°C) с процентом ингибирования от около 86% до около 90% (например, около 85,2%, около 85%, около 91%), как измеряется, например, с использованием формата «биологического анализа НЕК293», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека (например, при 25°C или при 37°C), демонстрирующие значение IC_{50} в диапазоне от около 360 пМ до около 5,8 нМ (например, около 357 пМ, около 400 пМ, около 500 пМ, около 600 пМ,

около 700 пМ, около 800 пМ, около 900 пМ, около 1 нМ, около 2 нМ, около 3 нМ, около 4 нМ, около 5 нМ), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа НЕК293» , как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[0128] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 обезьяны (например, при 25°C или при 37°C) с процентом ингибирования от около 81% до около 94% (например, около 80,2%, около 85%, около 90%, около 94,9%), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа НЕК293», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 обезьяны (например, при 25°C или при 37°C), демонстрирующие значение IC_{50} в диапазоне от около 660 пМ до около 30 нМ (например, около 654 пМ, около 700 пМ, около 750 пМ, около 800 пМ, около 850 пМ, около 900 пМ, около 950 пМ, около 1 нМ, около 10 нМ, около 15 нМ, около 20 нМ, около 25 нМ, около 30,3 нМ), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа НЕК293», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[0129] В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека (например, при 25°C или при 37°C) с процентом ингибирования от около 58% до около 103% (например, около 57,5%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 104%), как измеряется, например, с использованием формата «биоанализа НЕК293», как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В данном документе также раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TMPRSS6 человека (например, при 25°C или при 37°C), демонстрирующие значение IC_{50} в диапазоне от около 1,5 пМ до около 35 нМ (например, около 2 нМ, около 10 нМ, около 15 нМ, около 20 нМ, около 25 нМ, около 30 нМ, около 35,3 нМ), как измеряется, например, с использованием «биоанализа НЕК293» формате, как описано в примере 7 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[0130] В одном варианте осуществления в данном документе раскрыто выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком TMPRSS6, где антитело или его фрагмент проявляют одну или более из следующих характеристик: (а) ингибируют протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 человека, например, ингибируют TMPRSS6 человека, при этом процент ингибирования составляет более около 90%; (b) ингибируют протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 человека, например, ингибируют TMPRSS6 человека и имеют IC_{50} менее около 200 пМ; (с) ингибируют протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 мыши, например, ингибируют TMPRSS6 мыши, при этом процент ингибирования составляет

около 42%; (d) ингибируют протеазозависимое высвобождение гомоувелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 мыши, например, ингибируют TMPRSS6 мыши и имеют IC_{50} менее около 274 пМ; (e) ингибируют TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 65%; (f) ингибируют TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C и имеют IC_{50} менее около 10 нМ; (g) ингибируют TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 66%; (h) ингибируют TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C и имеют IC_{50} менее около 50 нМ; (i) ингибируют TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 58%; (j) ингибируют TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C и имеют IC_{50} менее около 35 нМ; (k) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; (l) содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3, указанных в таблице 1, и/или LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанных в таблице 1; и/или (m) содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности HCVR, указанной в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности LCVR, указанной в таблице 1.

[0131] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь одну или более из вышеупомянутых характеристик или любые их комбинации. Другие характеристики раскрытых антител и их антигенсвязывающих фрагментов будут очевидны для специалиста в данной области техники из обзора настоящего изобретения, включая рабочие примеры, приведенные в данном документе.

Картирование эпитопов и связанные технологии

[0132] В данном документе раскрыты антитела к TMPRSS6, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными в одной или более областях молекулы белка TMPRSS6. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных внутри любого из вышеупомянутых доменов молекулы белка TMPRSS6 (например, линейный эпитоп в домене). В качестве альтернатив эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри одного или обоих вышеупомянутых доменов молекулы белка. В одном варианте осуществления эпитоп представляет собой конформационный эпитоп.

[0133] Различные методики, известные специалистам в данной области техники, можно использовать для определения того, «взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами» внутри полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие методы включают сканирующий мутационный анализ аланина, пептидный

блот-анализ (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), кристаллографические исследования анализа расщепления пептида и ЯМР-анализ. Кроме того, могут быть использованы такие методы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496).

[0134] Другим методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является обмен водорода/дейтерия, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. Например, см. пример 8 настоящего изобретения. В общих чертах, метод обмена водорода/дейтерия включает мечение дейтерием белка, представляющего интерес, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносится в воду, и обменные протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антител, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород с более медленной скоростью, чем обменные протоны в аминокислотах, которые не являются частью границы раздела. В результате аминокислоты, которые образуют часть границы раздела белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, иметь относительно большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в границу раздела. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0135] Профилирование с помощью модификации (MAP), также известное как профилирование антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой метод, который классифицирует большое количество моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходством профиля связывания каждое антитело к химически или ферментативно модифицированной поверхности антигена (см. патент США 2004/0101920, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, явно отличающийся от эпитопа, представленного другой категорией, или частично перекрывающийся с ним. Эта технология позволяет быстро фильтровать генетически идентичные антитела, так что характеристика может быть сосредоточена на генетически различных антителах. При применении для скрининга гибридом MAP может облегчить идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют моноклональные антитела, имеющие требуемые характеристики. MAP можно использовать для сортировки антител, раскрытых в данном документе, на группы антител, связывающих разные эпитопы.

[0136] Настоящее изобретение включает антитела к TMPRSS6, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из специфических иллюстративных антител, указанных в таблице 1. Аналогично, в данном документе также раскрыты антитела к TMPRSS6, которые конкурируют за связывание с белком TMPRSS6

или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, указанных в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела к TMPRSS6, которые перекрестно конкурируют за связывание с белком TMPRSS6 с одним или более антителами, указанными в таблице 1.

[0137] Можно определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против TMPRSS6, или конкурирует за связывание с ним, используя обычные методы, известные в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к TMPRSS6, раскрытое в данном документе, эталонному антителу позволяют связываться с белком или пептидом TMPRSS6 в условиях насыщения. Далее оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой белка TMPRSS6. Если тестируемое антитело способно связываться с TMPRSS6 после насыщающего связывания с эталонным антителом к TMPRSS6, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к TMPRSS6. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком TMPRSS6 после насыщающего связывания с эталонным антителом к TMPRSS6, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом к TMPRSS6, раскрытым в данном документе.

[0138] Для того, чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к TMPRSS6, описанную выше методологию связывания выполняют в двух ориентациях: в первой ориентации эталонному антителу позволяют связываться с белком TMPRSS6 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой TMPRSS6. Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой TMPRSS6 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой TMPRSS6. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой TMPRSS6, то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с TMPRSS6. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или прилегающего эпитопа.

[0139] Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого антитела с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измеряется в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). В качестве альтернативы два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или

устраняют связывание другого антитела. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

[0140] Затем могут быть проведены дополнительные рутинные эксперименты (например, анализы пептидных мутаций и связывания) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается и эталонное антитело, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники.

Иммуноконъюгаты

[0141] Настоящее изобретение охватывает человеческое моноклональное антитело к TMPRSS6, конъюгированное с терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгат»), для лечения TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения (например, нарушения, связанного с перегрузкой железом). Используемый в данном документе термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или белком или терапевтическим средством. Антитело может быть связано с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или терапевтическим средством в любом месте молекулы, при условии, что оно способно связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления средство может представлять собой второе отличное антитело к белку TMPRSS6. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к TMPRSS6, будет учитывать состояние, подлежащее лечению, и требуемый терапевтический эффект, который необходимо достичь. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники; см., например, WO 05/103081.

Терапевтическое введение и составы

[0142] Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела к TMPRSS6 или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением будут вводиться с подходящими носителями, наполнителями и другими средствами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионные или

анионные) (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии «масло в воде» и «вода в масле», эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell *et al.* «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0143] Известны различные системы доставки, которые можно применять для введения фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, чрескожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и кишечника и т.д.), и ее можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в везикуле, в частности в липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

[0144] В данном документе также рассматривается применение наночастиц для доставки антител, раскрытых в данном документе. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно применять как для терапевтических, так и для диагностических вариантов применения. Наночастицы, конъюгированные с антителами, а также способы получения и применения подробно описаны Arruebo, M., *et al.* 2009 («Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications» in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включено в данный документ посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, к клеткам-мишеням. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, например, в US 8257740 или US 8246995, каждый из которых включен в данный документ во всей своей полноте.

[0145] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, таким образом, требуя лишь части системной дозы.

[0146] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривенных, внутрибрюшинных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть приготовлены с помощью общеизвестных способов.

[0147] Раскрытые фармацевтические композиции можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, устройство в виде шприца-ручки легко находит применение при доставке фармацевтической композиции, как раскрыто в данном документе. Такая шприц-ручка для доставки может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприце-ручке для доставки, как правило, используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку для доставки можно использовать повторно. В одноразовой шприце-ручке для доставки сменный картридж отсутствует. Скорее, шприц-ручка для доставки поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

[0148] Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в единичной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. К таким лекарственным формам в разовой дозе относятся, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.п.

Терапевтические варианты применения антител

[0149] Раскрытые антитела к TMPRSS6 и их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения и/или предупреждения заболевания или нарушения или состояния, ассоциированных с TMPRSS6, и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. В определенных вариантах осуществления раскрытое антитело к TMPRSS6 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в терапевтической дозе субъекту с заболеванием, нарушением или состоянием, ассоциированным с TMPRSS6.

[0150] В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения. В определенных вариантах осуществления TMPRSS6-ассоциированное заболевание или нарушение представляет собой нарушение, связанное с перегрузкой железом. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома врожденной дизэритропоэтической анемии, анемии Даймонда-Блэкфана, альфа-талассемии, бета-талассемии, гемолитической анемии, зависимой от переливания крови, миелодиспластического синдрома, серповидноклеточной анемии, истинной полицитемии, наследственного гемохроматоза, первичного гемохроматоза, вторичного гемохроматоза, тяжелого ювенильного гемохроматоза или хронического заболевания печени.

[0151] В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома, осложнения или признака бета-талассемии. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия представляет собой большую бета-талассемию или промежуточную бета-талассемию. Симптомы бета-талассемии включают утомляемость, слабость, бледность или желтоватость кожи, деформацию лицевых костей, медленный рост, вздутие живота, темную мочу и другие осложнения (например, осложнения вследствие терапии). Примеры осложнений бета-талассемии средней и тяжелой степени тяжести включают перегрузку железом, которая может быть результатом заболевания или частых переливаний крови и ассоциирована с повреждением таких органов, как сердце, печень и эндокринная система (например, гормонообразующие железы, которые регулируют процессы во всем организме), и повышенный риск заражения. Осложнения бета-талассемии тяжелой степени также могут включать деформации костей, увеличение селезенки, замедление темпов роста и проблемы с сердцем.

[0152] В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома, осложнения или признака гемохроматоза. Симптомы гемохроматоза включают, например, боль в суставах, боль в животе, слабость, утомляемость, диабет, потерю полового влечения, импотенцию, сердечную недостаточность, печеночную недостаточность, бронзовый или серый цвет кожи и спутанность памяти. Осложнения вследствие гемохроматоза включают, например, проблемы с печенью, проблемы с поджелудочной железой, проблемы с сердцем, репродуктивные проблемы и изменения цвета кожи.

[0153] В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома, осложнения или признака, ассоциированных с перегрузкой железом. Перегрузка железом может быть результатом генетического заболевания или нарушения, а также результатом частого переливания крови, потребления высоких доз добавок железа и/или инъекций, содержащих железо. Генетические нарушения, которые приводят к перегрузке железом, включают наследственный гемохроматоз, различные анемии, включая серповидноклеточную анемию и сидеробластную анемию, африканскую перегрузку железом (например, когда пораженные индивидуумы пьют напиток, содержащий большое количество железа), дефициты ферментов (например, дефициты пируваткиназы, дефициты глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) и нарушения транспорта белков, такие как ацерулоплазминемия и атрансферринемия.

[0154] Симптомы перегрузки железом включают, например, усталость (например, хроническую усталость), боль в суставах, боль в животе, заболевание печени (например, цирроз, рак печени), сахарный диабет, проблемы с сердцем (например, нерегулярный

сердечный ритм, сердечный приступ, сердечная недостаточность), изменение цвета кожи (например, бронзовый, пепельно-серо-зеленый), потерю менструации, потерю полового влечения, импотенцию, бесплодие, гипогонадизм, проблемы с костями (например, остеоартрит, остеопороз), проблемы с волосами, увеличение печени или селезенки, гипотиреоз, гипопитуитаризм, депрессию, проблемы с функцией надпочечников, нейродегенеративные заболевания с ранним началом (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона с ранним началом, болезнь Хантингтона, эпилепсию, рассеянный склероз) и повышенные маркеры, такие как уровень сахара в крови, ферменты печени, сывороточное железо, сывороточный трансферрин и сывороточный ферритин.

[0155] В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, ассоциированных с переливанием крови, например, получением частых и/или регулярных переливаний крови. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака, ассоциированных с физической травмой, которая приводит к кровопотере. В определенных вариантах осуществления физическая травма, приводящая к кровопотере, требует лечения с помощью переливания крови. По существу, симптом или признак, ассоциированные с физической травмой, приводящей к кровопотере, может представлять собой любой симптом или признак (например, перегрузка железом), которые ассоциированы с лечением физической травмы с помощью переливания крови. Например, физическая травма может представлять собой несчастный случай (например, приведший к потере конечности, травме тупым предметом, порезу), приводящий к кровопотере, требующей переливания крови. В определенных вариантах осуществления необходимое(ые) переливание(ия) крови представляет(ят) собой переливание большого объема крови.

[0156] В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака миелодиспластического синдрома. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака миелодиспластического синдрома с кольцевыми сидеробластами. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака гемолитической анемии, зависимой от переливания крови. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака трансфузионно-зависимой гемолитической анемии вследствие дефицита пируваткиназы (т.е. гемолитической анемии) или сидеробластной трансфузионно-зависимой гемолитической

анемии (т.е. сидеробластной анемии). В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака серповидноклеточной анемии. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака дизэритропоэтической анемии. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака эритропоэтической порфирии. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака хронического заболевания печени. В определенных вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для лечения или предупреждения по меньшей мере одного симптома или признака связанного с алкоголем хронического заболевания печени, гепатита С или аутоиммунного гепатита.

[0157] Также раскрыто применение раскрытых антител или их антигенсвязывающих фрагментов профилактически у субъектов, подверженных риску заболевания TMPRSS6-ассоциированным заболеванием или нарушением.

[0158] В некоторых вариантах осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты используются для приготовления фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения субъектов, страдающих заболеванием, нарушением или состоянием, раскрытыми в данном документе. В другом варианте осуществления раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты используются в качестве дополнительной терапии с любым другим средством или любой другой терапией, известной специалистам в данной области техники, применимой для лечения или облегчения заболевания, нарушения или состояния, раскрытых в данном документе.

Комбинированные виды терапии

[0159] Комбинированные виды терапии могут включать одно или более раскрытых антител или их антигенсвязывающих фрагментов и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно предпочтительно комбинировать с раскрытыми антителами или их антигенсвязывающими фрагментами. Раскрытые антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно синергически комбинировать с одним или более лекарственными средствами или терапией, применяемыми для лечения TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления раскрытые антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно комбинировать со вторым терапевтическим средством для облегчения одного или более симптомов указанного заболевания или состояния.

[0160] В зависимости от заболевания, нарушения или состояния антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, можно применять в

комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. Например, если заболевание, нарушение или состояние ассоциированы с перегрузкой железом, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, можно применять в комбинации с одним или более видами терапии для снижения уровня железа и/или видами терапии, которые в настоящее время применяются для лечения перегрузки железом.

[0161] В определенных вариантах осуществления для лечения перегрузки железом можно применять терапию хелаторами железом. Терапия хелаторами железа представляет собой фармакологическое удаление железа с помощью средства, хелатирующего железо. Примеры средств, хелатирующих железо, включают дефероксамин, деферазирокс и деферипрон. (см., например, Mobarra et al., *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* (2016) 10(4): 239-247). Специалистам в данной области техники известны другие примеры средств, хелатирующих железо, например те, которые рассмотрены в Hatcher et al., *Future Med. Chem.* (2009) 1(9):1643-70.

[0162] Другие виды терапии, которые можно применять для лечения перегрузки железом, включают применение таких средств, как без ограничения витамин Е, масло зародышей пшеницы, токоферсолан, индиаксантин, фолиевая кислота, средства, которые повышают уровни фетального гемоглобина (например, гидроксимочевину, ингибиторы гистондеацетилазы и/или ингибиторы ДНК-метилтрансферазы (например, производные бутирата, азациитидин, децитабин (5-аза-2-дезоксцитидин) и трихостатин-А), гемин, помалидомид, талидомид, цитокины, такие как фактор стволовых клеток (SCF) и трансформирующий фактор роста бета (TGF бета)), средства для лечения язв, средства для борьбы с инфекцией (например, антибиотики и противовирусные средства), средства для лечения тромбоза или средства для лечения анемии (например, луспатерцепт).

[0163] Избыток железа также можно лечить с помощью трансплантации стволовых клеток или костного мозга, переливания крови или кровопускания.

[0164] Используемый в данном документе термин «в комбинации с» означает, что дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения антител к TМPRSS6 или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. Термин «в комбинации с» также включает последовательное или одновременное введение одного или более раскрытых антител к TМPRSS6 или антигенсвязывающих фрагментов и второго терапевтического средства.

[0165] Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту до введения одного или более раскрытых антител к TМPRSS6 или их антигенсвязывающих фрагментов. Например, первый компонент можно считать введенным «до» второго компонента, если первый компонент вводится за 1 неделю, за 72 часа, за 60 часов, за 48 часов, за 36 часов, за 24 часа, за 12 часов, за 6 часов, за 5 часов, за 4 часа, за 3 часа, за 2 часа, за 1 час, за 30 минут или менее чем за 30 минут до введения второго компонента.

[0166] В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически

активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту после введения одного или более раскрытых антител к TMPRSS6 или их антигенсвязывающих фрагментов. Например, можно считать, что первый компонент вводится «после» второго компонента, если первый компонент вводится через 30 минут, через 1 час, через 2 часа, через 3 часа, через 4 часа, через 5 часов, через 6 часов, через 12 часов, через 24 часа, через 36 часов, через 48 часов, через 60 часов, через 72 часа или более после введения второго компонента.

[0167] В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением одного или более раскрытых антител к TMPRSS6 или их антигенсвязывающих фрагментов. «Одновременное» введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение субъекту одного или более раскрытых антител к TMPRSS6 или их антигенсвязывающих фрагментов и дополнительного терапевтически активного компонента в разовой лекарственной форме, или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту с интервалом около 30 минут или менее друг от друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, как антитело к TMPRSS6, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); в качестве альтернативы каждую лекарственную форму можно вводить различным путем (например, раскрытое антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). Введение компонентов в разовой лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями считается «одновременным введением» для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения введение одного или более раскрытых антител к TMPRSS6 или их антигенсвязывающих фрагментов «до», «одновременно с» или «после» (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением раскрытого антитела к TMPRSS6 или его антигенсвязывающего фрагмента «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом.

[0168] В данном документе также раскрыты фармацевтические композиции, в которых антитело к TMPRSS6 или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, составлены совместно с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в других разделах в данном документе.

Диагностические варианты применения антител

[0169] Раскрытые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты можно применять для обнаружения и/или измерения TMPRSS6 в образце, например, в диагностических целях. В данном документе раскрыты варианты применения раскрытых антител и их антигенсвязывающих фрагментов в анализах для обнаружения TMPRSS6-ассоциированного заболевания или нарушения. Иллюстративные диагностические анализы TMPRSS6 могут включать, например, приведение в контакт образца,

полученного от пациента, с антителом к TMPRSS6 или антигенсвязывающим фрагментом, раскрытыми в данном документе, которые мечены детектируемой меткой или репортерной молекулой. Раскрытые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты также можно применять в качестве захватывающего лиганда для селективного выделения TMPRSS6 из образцов от субъекта. В качестве альтернативы немеченое антитело или его фрагмент к TMPRSS6 можно применять в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе мечено обнаружимым образом. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для обнаружения или измерения TMPRSS6 в образце, включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и сортировку клеток, активируемую флуоресценцией (FACS).

[0170] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах TMPRSS6, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит обнаруживаемые количества белка TMPRSS6 или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни белка TMPRSS6 в конкретном образце, полученном от здорового субъекта (например, пациента, не пораженного заболеванием, ассоциированным с TMPRSS6), могут быть измерены для первоначального установления исходного или стандартного уровня TMPRSS6. Этот исходный уровень TMPRSS6 затем можно сравнить с уровнями TMPRSS6, измеряемыми в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие TMPRSS6-ассоциированного состояния или симптомов, ассоциированных с таким состоянием.

[0171] Антитела к TMPRSS6 или их антигенсвязывающие фрагменты могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления меткой или фрагментом является биотин. В анализе связывания расположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально к поверхности.

ПРИМЕРЫ

[0172] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получить и использовать способы и композиции, раскрытые в данном документе, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количеств, значений температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное,

части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C и давление равно атмосферному или является близким к нему.

Пример 1. Получение человеческих антител к трансмембранной сериновой протеазе 6 (TMPRSS6)

[0173] Человеческие антитела к белку TMPRSS6 получали у мышей VELOCIMMUNE[®], содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали и стимулировали бустерной дозой ДНК TMPRSS6 человека путем гидродинамической доставки ДНК.

[0174] Антитела к TMPRSS6 выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток мыши без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. С помощью этого способа получали несколько полностью человеческих антител к TMPRSS6 (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами).

[0175] Иллюстративные антитела, полученные, как описано выше, обозначали как mAb37746, mAb37763, mAb37777, mAb37699, mAb41422, mAb41465 и mAb41450, имеющие аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот HCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCVR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в таблице 1 и таблице 2.

[0176] Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи

[0177] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, последовательностей CDR и последовательностей тяжелой и легкой цепей выбранных иллюстративных антител к TMPRSS6.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

ID антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	LCVR	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
mAb37746	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb37763	22	24	26	28	10	12	14	16
mAb37777	32	34	36	38	10	12	14	16
mAb37699	42	44	46	48	50	52	54	56

mAb41422	62	64	66	68	70	72	74	76
mAb41465	82	84	86	88	90	92	14	94
mAb41450	100	102	104	106	108	110	14	112

[0178] Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот выбранных иллюстративных антител к TMPRSS6 представлены в таблице 2.

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

ID антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3	LCV R	L- CDR1	L- CDR2	L- CDR3
mAb37746	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb37763	21	23	25	27	9	11	13	15
mAb37777	31	33	35	37	9	11	13	15
mAb37699	41	43	45	47	49	51	53	55
mAb41422	61	63	65	67	69	71	73	75
mAb41465	81	83	85	87	89	91	13	93
mAb41450	99	101	103	105	107	109	13	111

[0179] Антитела могут иметь изотип Fc человека или мыши. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши может быть преобразовано в антитело с IgG1 человека или IgG4 человека и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблице 1, останутся прежними, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по сути сходными независимо от природы Fc-домена.

[0180] Если не указано иное, все антитела, используемые в следующих примерах, содержат Fc IgG4 человека, содержащий мутацию серина на пролин в шарнирной области (S108P). Иллюстративные антитела mAb37746, mAb37763, mAb37777, mAb37699, mAb41422, mAb41465 и mAb41450, содержащие Fc IgG4 человека, содержащий мутацию серина на пролин в шарнирной области (S108P), обозначали как REGN7969, REGN7971, REGN7973, REGN8023, REGN7974, REGN7977 и REGN7999 соответственно. В таблице 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей полноразмерных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи этих антител.

Таблица 3

ID антитела	Название антитела	SEQ ID NO:			
		HC		LC	
		ДНК	PEP	ДНК	PEP

mAb37746	REGN7969	17	18	19	20
mAb37763	REGN7971	29	30	19	20
mAb37777	REGN7973	39	40	19	20
mAb37699	REGN8023	57	58	59	60
mAb41422	REGN7974	77	78	79	80
mAb41465	REGN7977	95	96	97	98
mAb41450	REGN7999	113	114	115	116

Пример 3. Связывание антител с TMPRSS6, как определяется с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Экспериментальная процедура

[0181] Равновесную константу диссоциации (K_D) для связывания TMPRSS6 с различными моноклональными антителами к TMPRSS6 (mAb) определяли с использованием биосенсора для поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием прибора Biacore 4000. Все исследования связывания проводили в 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% объем/объем поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) в рабочем буфере при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали путем сочетания амина с mAb мыши, специфическим к Fc человека, для захвата различных mAb к TMPRSS6. Для эксперимента использовали несколько белков-реагентов TMPRSS6, включая внеклеточный домен TMPRSS6 человека с мутацией S762A, экспрессируемой с помощью С-концевой метки мус-мус-гексагистидина (обозначаемой hTMPRSS6_S762A-MMH; REGN5330; SEQ ID NO: 117), внеклеточный домен TMPRSS6 *Macaca fascicularis* с мутацией S751A, экспрессируемой с помощью С-концевой метки мус-мус-гексагистидина (обозначаемой mTMPRSS6_S751A-MMH; REGN5977; SEQ ID NO: 119), и внеклеточный домен TMPRSS6 мыши с мутацией S762A, экспрессируемой с С-концевой меткой мус-мус-гексагистидина (обозначаемой mTMPRSS6_S762A-MMH; REGN6848; SEQ ID NO: 118). Различные концентрации (от 100 нМ до 3,7 нМ, 3-кратное серийное разведение) белков-реагентов TMPRSS6, приготовленных в рабочем буфере HBS-EP, вводили на поверхность, захваченную mAb к TMPRSS6, в течение 150 секунд со скоростью потока 30 мкл/мин, и их диссоциацию в рабочем буфере HBS-ET контролировали в течение 10 минут. В конце каждого цикла захваченную поверхность mAb к TMPRSS6 регенерировали с использованием 12-секундной инъекции 20 мМ фосфорной кислоты.

[0182] Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определяли путем подгонки сенсорграмм связывания в реальном времени к модели связывания 1:1 с ограничением переноса массы с использованием программного обеспечения для подбора кривых Scrubber 2.0 (BioLogic Software). Константу равновесия при диссоциации связывания (K_D) и диссоциативный период полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали по кинетическим скоростям как:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{и} \quad t^{1/2}(\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Результаты

[0183] Параметры кинетики связывания различных выбранных mAb к TMPRSS6 с каждым белком-реагентом TMPRSS6 показаны в таблицах 4-9.

Таблица 4. Параметры кинетики связывания различных mAb к TMPRSS6, связывающихся с hTMPRSS6_S762A-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (мин)
REGN7969	142 ± 0,6	89	4,04E+05	1,82E-04	4,50E-10	64
REGN7971	164 ± 5	103	4,55E+05	1,47E-04	3,22E-10	79
REGN7973	152 ± 2,8	134	2,52E+05	1,57E-04	6,26E-10	73
REGN7974	156 ± 3	191	2,59E+05	6,80E-04	2,63E-09	17
REGN7977	138 ± 0,4	159	2,18E+05	3,68E-04	1,69E-09	31
REGN7999	131 ± 0,8	176	2,67E+05	6,49E-05	2,43E-10	178
REGN8023	160 ± 1,1	205	6,71E+05	8,60E-05	1,28E-10	134

[0184] Как показано в таблице 4, выбранные mAb к TMPRSS6 связывались с hTMPRSS6_S762A-ММН при 25°C со значениями K_D в диапазоне от около 128 пМ до около 2,63 нМ.

Таблица 5. Параметры кинетики связывания различных mAb к TMPRSS6, связывающихся с hTMPRSS6_S762A-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (мин)
REGN7969	145 ± 3,6	110	2,22E+05	9,75E-04	4,40E-09	12
REGN7971	187 ± 4,6	169	2,61E+05	6,37E-04	2,44E-09	18
REGN7973	176 ± 2,7	164	5,95E+04	1,26E-03	2,12E-08	9
REGN7974	181 ± 3,2	206	1,11E+05	2,35E-03	2,12E-08	4,9
REGN7977	131 ± 1,2	134	1,13E+05	1,24E-03	1,10E-08	9
REGN7999	106 ± 1,5	129	1,54E+05	3,54E-04	2,30E-09	33
REGN8023	147 ± 1,8	205	4,18E+05	9,35E-04	2,24E-09	12

[0185] Как показано в таблице 5, выбранные mAb к TMPRSS6 связывались с hTMPRSS6_S762A-ММН при 37°C со значениями K_D в диапазоне от около 2,24 нМ до около 21,2 нМ.

Таблица 6. Параметры кинетики связывания различных mAb к TMPRSS6, связывающихся с mfTMPRSS6_S751A-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t^{1/2}$ (мин)
REGN7969	142 ± 0,6	92	4,19E+05	1,82E-04	4,35E-10	63
REGN7971	168 ± 2	109	4,87E+05	1,38E-04	2,83E-10	84
REGN7973	157 ± 1,4	132	2,17E+05	5,14E-04	2,37E-09	22
REGN7974	160 ± 1,6	188	2,68E+05	1,92E-03	7,18E-09	6
REGN7977	137 ± 0,5	155	2,25E+05	6,97E-04	3,09E-09	17
REGN7999	130 ± 0,5	185	6,60E+05	7,23E-05	1,10E-10	160
REGN8023	161 ± 3,3	203	8,91E+05	5,79E-05	6,50E-11	199

[0186] Как показано в таблице 6, выбранные mAb к TMPRSS6 связывались с mfTMPRSS6_S751A-ММН при 25°C со значениями K_D в диапазоне от около 65 пМ до около 7,18 нМ.

Таблица 7. Параметры кинетики связывания различных mAb к TMPRSS6, связывающихся с mfTMPRSS6_S751A-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t^{1/2}$ (мин)
REGN7969	138 ± 1,3	105	2,83E+05	9,24E-04	3,27E-09	12
REGN7971	178 ± 1,8	160	3,63E+05	6,10E-04	1,68E-09	19
REGN7973	168 ± 1,2	145	1,32E+05	3,40E-03	2,57E-08	3,4
REGN7974	173 ± 2	183	2,51E+05	4,05E-03	1,61E-08	2,9
REGN7977	128 ± 0,9	133	2,07E+05	2,47E-03	1,19E-08	4,7
REGN7999	104 ± 1	143	4,08E+05	3,06E-04	7,50E-10	38
REGN8023	144 ± 1,6	206	6,32E+05	6,34E-04	1,00E-09	18

[0187] Как показано в таблице 7, выбранные mAb к TMPRSS6 связывались с mfTMPRSS6_S751A-ММН при 37°C со значениями K_D в диапазоне от около 750 пМ до около 25,7 нМ.

Таблица 8. Параметры кинетики связывания различных mAb к TMPRSS6, связывающихся с mTMPRSS6_S762A-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t^{1/2}$ (мин)
REGN7969	140 ± 0,4	4	св.от.*	св.от.*	св.от.*	св.от.*

REGN7971	169 ± 1,2	5	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7973	158 ± 0,9	7	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7974	160 ± 0,5	3	св.от.*	св.от.*	св.от.*	св.от.*
REGN7977	136 ± 0,9	20	2,88E+05	6,70E-02	2,33E-07	0,17
REGN7999	128 ± 0,4	178	4,16E+05	3,45E-05	8,29E-11	334
REGN8023	157 ± 1,5	209	5,99E+05	1,10E-03	1,84E-09	10

св.от.* означает, что в конкретных экспериментальных условиях этого примера связывание не наблюдалось.

IC[#] означает, что наблюдаемые данные по связыванию были неубедительными и кинетические параметры связывания не могли быть определены в конкретных экспериментальных условиях этого примера.

[0188] Как показано в таблице 8, три из семи выбранных mAb к TMPRSS6 связывались с mTMPRSS6_S762A-ММН при 25°C со значениями K_D в диапазоне от около 82,9 пМ до около 233 нМ.

Таблица 9. Параметры кинетики связывания различных mAb к TMPRSS6, связывающихся с mTMPRSS6_S762A-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	KD (М)	t _{1/2} (мин)
REGN7969	128 ± 0,8	2	св.от.*	св.от.*	св.от.*	св.от.*
REGN7971	170 ± 2,2	15	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7973	162 ± 4,1	12	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7974	164 ± 0,9	3	св.от.*	св.от.*	св.от.*	св.от.*
REGN7977	123 ± 0,7	9	3,23E+05	2,27E-01	7,03E-07	0,05
REGN7999	99 ± 0,8	130	5,05E+05	1,60E-04	3,17E-10	72
REGN8023	138 ± 1,4	189	2,69E+05	6,66E-03	2,47E-08	1,7

св.от.* означает, что в конкретных экспериментальных условиях этого примера связывание не наблюдалось.

IC[#] означает, что наблюдаемые данные по связыванию были неубедительными и кинетические параметры связывания не могли быть определены в конкретных экспериментальных условиях этого примера.

[0189] Как показано в таблице 9, три из семи выбранных mAb к TMPRSS6 связывались с mTMPRSS6_S762A-ММН при 37°C со значениями K_D в диапазоне от около 317 пМ до около 703 нМ.

Пример 4. Перекрестная конкуренция между выбранными моноклональными антителами к TMPRSS6

Экспериментальная процедура

[0190] Конкуренцию за связывание между моноклональными антителами (mAb) к TMPRSS6 определяли с использованием анализа интерферометрии биослоя (BLI) без меток в реальном времени на биосенсорной платформе Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% объем/объем поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA, 0,02% NaN₃, буфере pH7,4 (HBS-EBT) со встряхиванием планшета при скорости 1000 об/мин. Для оценки того, способны ли 2 mAb конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами на TMPRSS6, рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена TMPRSS6 человека, экспрессируемого с мутацией S762A, и C-концевой метки тус-тус-гексагистидина (обозначаемой как hTMPRSS6_S762A-MMH; REGN5330SEQ ID NO: 117) сначала захватывали на наконечниках биосенсоров Octet, покрытых антителом к пента-His (HIS1K), погружая кончики биосенсоров на 1 минуту в лунки, содержащие 10 мкг/мл раствора hTMPRSS6_S762A-MMH. Захваченные наконечники биосенсоров hTMPRSS6_S762A-MMH затем насыщали первым mAb к TMPRSS6 (обозначаемым mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие раствор mAb-1 с концентрацией 50 мкг/мл, на 4 минуты. Затем наконечники биосенсоров погружали в лунки, содержащие раствор 50 мкг/мл второго mAb к TMPRSS6 (обозначаемого mAb-2), на 3 минуты. Наконечники биосенсоров промывали буфером HBS-EBT между каждым этапом эксперимента. Ответ связывания контролировали в реальном времени в течение всего эксперимента, и ответ связывания в конце каждого этапа записывали.

Результаты

[0191] Сравнивали ответ связывания mAb-2 с hTMPRSS6_S762A-MMH, предварительно подвергнутого образованию комплекса с mAb-1, и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных выбранных mAb к TMPRSS6, как показано в таблице 10.

Таблица 10. Перекрестная конкуренция между моноклональными антителами к TMPRSS6

mAb-1	показано mAb-2, конкурирующее с mAb-1
REGN7974	REGN7974
	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7973	REGN7974
	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7977	REGN7974

	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7999	REGN7974
	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7969	REGN7969
	REGN7971
	REGN8023
REGN7971	REGN7969
	REGN7971
	REGN8023
REGN8023	REGN7969
	REGN7971
	REGN8023

Пример 5. Связывание антитела с клетками, экспрессирующими TMPRSS6

Экспериментальная процедура

[0192] Для оценки связывания клеток с помощью раскрытых антител к TMPRSS6, клетки HEK293 конструировали так, чтобы стабильно сверхэкспрессировать полноразмерный TMPRSS6 у человека (эталонная последовательность NM_001289001 в NCBI), яванского макака/*Macaca fascicularis* (эталонная последовательность XM_005567384 в NCBI) и мыши (эталонная последовательность NM_027902.2 в NCBI), и эти клеточные линии обозначаются как HEK293/hTMPRSS6, HEK293/mfTMPRSS6 и HEK293/mTMPRSS6 соответственно. Кроме того, конструировали клетки HEK293 для стабильной сверхэкспрессии каталитически неактивного полноразмерного TMPRSS6 человека, где серин в положении 753 эталонной последовательности NM_001289001 в NCBI замещали на аланин. Эта клеточная линия обозначается HEK293/hTMPRSS6 (S762A). Все клеточные линии не были отсортированы, за исключением линии клеток с TMPRSS6 мыши (HEK293/mTMPRSS6), которую сортировали в отношении высокой экспрессии TMPRSS6 мыши.

[0193] Для оценки связывания антител к TMPRSS6 по настоящему изобретению с рецептором, экспрессируемым на поверхности клетки, антитела (включая контроль подкласса IgG) серийно разводили в аналитическом буфере (PBS без Ca^{++} и Mg^{++} , содержащий 2% FBS) от 375 нМ до 22,9 пМ (плюс образец, содержащий только буфер для анализа без тестируемой молекулы) и инкубировали с $0,5 \times 10^6$ клеток/лунка при 4°C в течение 30 минут в буфере для анализа. После инкубации с первичными антителами

клетки окрашивали 4,0 мкг/мл конъюгированных с Alexa Fluor®-647 вторичных антител (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., антитело к человеческому антителу № 109-607-003) при 4°C в течение 30 минут. Клетки фиксировали с помощью BD CytoFix™ (Becton Dickinson, № 554655) и анализировали на проточных цитометрах IQue® или IQue®Plus (Intellicyt®). Неокрашенные контроли и контроли на основе вторичных антител в отдельности также тестировали для всех клеточных линий. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения ForeCyt® (IntelliCyt®) для определения средних геометрических значений флуоресценции жизнеспособных клеток, а коэффициент связывания рассчитывали путем нормализации среднего геометрического значения тестируемого условия на среднее геометрическое значение соответствующих неокрашенных клеток.

Результаты

[0194] В таблице 11 показано связывание выбранных антител к TMPRSS6 с клетками, сконструированными для экспрессии hTMPRSS6, hTMPRSS6 (S762A), mfTMPRSS6 и mTMPRSS6.

Таблица 11. Связывание антител к TMPRSS6 с клетками HEK293/TMPRSS6

		MFI - нормализованный по отношению к неокрашенному контролю									
TMPRSS6 экспрессируется в клетках HEK293	TMPRSS6 отсутствует		hTMPRSS6		hTMPRSS6 (S762A)		mfTMPRSS6		mTMPRSS6		
	Максимальная кратность связывания	EC ₅₀ (M)	Максимальная кратность связывания	EC ₅₀ (M)	Максимальная кратность связывания	EC ₅₀ (M)	Максимальная кратность связывания	EC ₅₀ (M)	Максимальная кратность связывания	EC ₅₀ (M)	
REGN7 969	3	Связывание отсутствует	52	6,7E-10	170	2,0E-09	50	1,2E-09	1	Связывание отсутствует	
REGN7 971	3	Связывание	66	9,7E-10	209	1,7E-09	75	1,5E-09	1	Связывание	

		отсутств ует								отсутств ует
REGN7 973	4	Связыва ние отсутств ует	58	2,7E-09	145	2,0E-09	91	3,3E-09	42	3,5E-08
REGN7 974	3	Связыва ние отсутств ует	54	2,4E-09	234	2,3E-09	50	3,6E-09	1	Связыва ние отсутств ует
REGN7 977	5	3,1E-08	69	1,9E-09	156	1,6E-09	78	2,4E-09	125	9,1E-09
REGN7 999	4	Связыва ние отсутств ует	50	2,2E-09	420	2,2E-09	79	2,0E-09	421	4,5E-09
REGN8 023	3	Связыва ние отсутств ует	47	7,0E-10	300	2,0E-09	52	9,4E-10	296	8,4E-10
Контро ль подклас са hIgG	2	Связыва ние отсутств ует	1	Связыв ание отсутст вует	3	Связыв ание отсутст вует	1	Связыв ание отсутст вует	1	Связыва ние отсутств ует
Антител о к 2” человек а в отдельн ости	2	Связыва ние отсутств ует	1	Связыв ание отсутст вует	2	Связыв ание отсутст вует	1	Связыв ание отсутст вует	1	Связыва ние отсутств ует

[0195] Как показано в таблице 11, выбранные антитела к TMPRSS6 продемонстрировали связывание с TMPRSS6 человека, яванского макака и S762A человека, экспрессируемым на клетках HEK293. Диапазон максимальных кратностей связывания и значений EC₅₀ составлял от около 47 до 69 раз и от около 670 пМ до 2,7 нМ для клеток, экспрессирующих hTMPRSS6, от около 145 до 420 раз и от около 1,6 до 2,3

нМ для клеток, экспрессирующих hTMPRSS6 (S762A), и от около 50 до 91 раз и от около 940 пМ до 3,6 нМ для клеток, экспрессирующих mTMPRSS6. Для четырех моноклональных антител, которые связывались с клетками, экспрессирующими mTMPRSS6, диапазон максимальных кратностей связывания и значений EC₅₀ составлял от около 42 до 421 раз и от около 840 пМ до 35 нМ. Выбранные антитела к TMPRSS6 продемонстрировали связывание с исходными клетками HEK293 с коэффициентами связывания от около 3 до 5 раз. Образцы контрольного антитела подкласса IgG (контроль подкласса hIgG) и вторичного антитела в отдельности (антитело к 2^м человека в отдельности) демонстрировали коэффициенты связывания в диапазоне от около 1 до 3 раз.

Пример 6. Обнаружение гемоювелина человека (HJV)

Экспериментальная процедура

[0196] Для дополнительной характеристики способности моноклональных антител (mAb) к TMPRSS6 ингибировать TMPRSS6, использовали клеточный биоанализ с двумя различными показаниями. TMPRSS6 выступает в качестве отрицательного регулятора экспрессии гепсидина путем расщепления гемоювелина клеточной поверхности (HJV). См., например, Rausa et al. *J. Cell. Mol. Med.* (2015) 19:879-888; and Lee P., *Acta Haematol.* (2009) 122:87-96.

[0197] Для анализа использовали проточную цитометрию для измерения гемоювелина человека (hHJV) на клеточной поверхности, а анализ ELISA проводили для количественной оценки уровня растворимого hHJV в клетках HEK293, экспрессирующих полноразмерный HJV человека и TMPRSS6 человека или мыши. Клеточные линии для биоанализа коэкспрессии конструировали с использованием клеток HEK293, экспрессирующих hHJV, в качестве исходной клеточной линии (hHJV; аминокислоты 1-426, эталонная последовательность NP_998818.1 в NCBI). Исходную клеточную линию со стабильной экспрессией HJV человека отбирали с использованием 500 мкг/мл G418 в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 10% (объем/объем) фетальной бычьей сыворотки, 100 единиц пенициллина, 100 мкг стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамин. Эти клетки HEK293, экспрессирующие hHJV (HEK293.hHJV), затем обогащали для обеспечения высокой экспрессии на поверхности клеток hHJV с помощью FACS (антитело к гемоювелину; Abcam ab54431, ослиное антитело к IgG мыши AF647; Invitrogen A-31571). Для экспрессии TMPRSS6 HEK293.hHJV трансдуцировали лентивирусными супернатантами либо для полноразмерного TMPRSS6 человека (hTMPRSS6; аминокислоты 1-811, эталонная последовательность NM_153609.3 в NCBI), либо для полноразмерного TMPRSS6 мыши (mTMPRSS6; аминокислоты 1-811, эталонная последовательность NM_027902.2 в NCBI) с тройной меткой мус на С-конце. Полученные клеточные линии обозначали HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6 и HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6 соответственно. Клетки, трансдуцированные лентивирусом, дополнительно отбирали с использованием 500 мкг/мл G418 и 100 мкг/мл гигромицина В в течение 2 недель и сортировали в отношении популяции с

высоким уровнем экспрессии TMPRSS6 с использованием антитела к Мус AF647.

[0198] Для ELISA клеточные линии для анализа помещали в 96-луночные планшеты с плоским дном по 1×10^4 клеток/лунка. Антитела по настоящему изобретению, а также контрольные образцы серийно разводили (от 0 нМ до 200 нМ), затем добавляли в каждую лунку, содержащую конечный объем 100 мкл, и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день собирали супернатанты и проводили ELISA с использованием набора для ELISA человека RGM-C/Hemojuvelin DuoSet (R&D Systems, DY3720-05) в соответствии с протоколом производителя. Оптическую плотность получали с использованием SpectraMax i3 (Molecular Devices), а результаты анализировали с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad) для получения значений IC₅₀. Процент ингибирования рассчитывали по следующему уравнению:

$$\text{Ингибирование, [\%]} = \frac{\text{Растворимый HJV}_{\text{исходный уровень}} - \text{Растворимый HJV}_{\text{антителом}}}{\text{Растворимый HJV}_{\text{исходный уровень}} - \text{Растворимый HJV}_{\text{ингибитор протеазы}}} \times 100$$

[0199] В этом уравнении «растворимый HJV_{исходный уровень}» обозначает количество растворимого HJV из супернатанта клеток со сверхэкспрессией HJV-TMPRSS6 в отсутствие обработки антителами или ингибитором протеазы. «Растворимый HJV_{антителом}» обозначает количество растворимого HJV в максимальной концентрации анализируемых образцов, обработанных антителами, а «растворимый HJV_{ингибитор протеазы}» обозначает количество растворимого HJV из обработанного ингибитором сериновой протеазы, апротинином (Sigma, кат. номер: 10236624001), образца.

[0200] Для анализа FACS клетки HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6 или клетки HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6 обрабатывали 50 нМ антител к TMPRSS6 в течение ночи. На следующий день клетки собирали для поверхностного окрашивания. Для окрашивания клеточной поверхности hHJV в тестируемых клеточных линиях клетки блокировали блокатором FcR (MilteNY Biotech, 130-059-901) и окрашивали антителом к гемоювелину (Abcam ab54431, 1:400, на льду, 1 час) с последующей инкубацией с ослиным антителом к IgG мыши AF647 (Invitrogen A-31571, 1:2000, на льду, 40 минут). Окрашенные клетки измеряли с использованием проточного цитометра Accuri C6 (BD).

[0201] В анализ на основе ELISA ингибитор сериновой протеазы, апротинин (2 мкг/мл), и смесь ингибиторов протеазы (Sigma, кат. номер: P-1860, 1:200) включали в качестве контроля для блокирования протеазной активности в клетках HEK293.hHJV/3xMyc.TMPRSS6. Для FACS апротинин (2 мкг/мл) включали в качестве контроля для блокирования активности протеазы в клетках HEK293.hHJV/3xMyc.TMPRSS6.

Результаты

[0202] В таблице 12 показано ингибирование протеазозависимого высвобождения HJV с поверхности клеток антителами к TMPRSS6.

Таблица 12. Эффективность блокирования антител к TMPRSS6 в клеточных линиях со сверхэкспрессией HEK293.hHJV/3xMyc.TMPRSS6, как измеряется с

помощью ELISA

Клеточные линии для анализа	HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6		HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6	
	S6		RSS6	
<i>mAb</i>	Ингибирование (%)	IC ₅₀ [M]	Ингибирование (%)	IC ₅₀ [M]
REGN7969	> 99	7,12E-11	< 1	н/п
REGN7971	89,9	7,74E-11	10,2	н/п
REGN7973	> 99	1,99E-10	9,4	н/п
REGN7974	> 99	1,54E-10	11,8	н/п
REGN7977	> 99	1,27E-10	46,4	н/п
REGN7999	> 99	1,02E-10	98,5	8,26E-11
REGN8023	> 99	1,49E-10	42,0	2,74E-10
Изотипический контроль	15,7	н/п	5,2	н/п
Без обработки	0,0	н/п	< 1	н/п
Апротинин	> 99	н/п	> 99	н/п
Коктейль на основе ингибиторов протеазы	>99	н/п	>99	н/п

н/п - не применимо.

[0203] Как показано в таблице 12, все выбранные антитела к TMPRSS6 продемонстрировали >90% ингибирование протеазозависимого высвобождения HJV с поверхности клеток в клетках, экспрессирующих TMPRSS6 человека, и значения IC₅₀ находились в диапазоне от около 70 до около 200 пМ. Два антитела, REGN7999 и REGN8023, продемонстрировали ингибирующие эффекты в клетках, экспрессирующих TMPRSS6 мыши, демонстрируя около 98,5% и около 42% ингибирование активности протеазы мыши TMPRSS6 и значения IC₅₀, составляющие около 82,6 пМ и около 274 пМ соответственно.

[0204] В таблице 13 показано ингибирование экспрессии HJV на клеточной поверхности антителами к TMPRSS6.

Таблица 13. Уровень экспрессии гемояуелина на клеточной поверхности в клеточных линиях со сверхэкспрессией HEK293.hHJV/3xMyc.TMPRSS6, как измеряется с помощью проточной цитометрии

Клеточные линии для	HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6	HEK293.hHJV/ 3xMyc.mTMPRSS6
------------------------	----------------------------	--------------------------------

анализа				
mAb	Среднее геометрическое интенсивности флуоресценции	Медиана интенсивности флуоресценции	Среднее геометрическое интенсивности флуоресценции	Медиана интенсивности флуоресценции
REGN7969	47932	67517	8394	7813
REGN7971	61850	84416	8228	7472
REGN7973	46109	63527	8190	7441
REGN7974	40885	56698	6956	6224
REGN7977	49022	63785	9128	7030
REGN7999	30702	40146	23698	33576
REGN8023	55465	77830	18957	19405
Изотипический контроль	11684	12981	7750	7233
Без обработки	13342	15024	9605	8897
Апротинин	42301	58097	26671	38081

[0205] Как показано в таблице 13, все выбранные антитела к TMPRSS6 предупреждали отщепление HJV с поверхности клеток HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6. REGN7999 и REGN8023 также предупреждали отщепление HJV с поверхности клеток HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6.

Пример 7. Ингибирование ферментативной активности TMPRSS6

Экспериментальная процедура

[0206] Для оценки ингибирования ферментативной активности TMPRSS6 антителами к TMPRSS6 проводили два биоанализа. В обоих биоанализах антитела к TMPRSS6 или контроль подкласса IgG серийно разводили в аналитическом буфере (PBS+Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺) от 500 нМ до 122,1 пМ (плюс образец, содержащий только аналитический буфер без тестируемой молекулы).

[0207] Первый биоанализ («биоанализ CM») проводили с внеклеточным доменом TMPRSS6, полученным в виде кондиционированной среды (CM). CM получали путем конструирования клеток CHO для продуцирования и секреции внеклеточного домена TMPRSS6 человека (аминокислоты 68-802 из эталонной последовательности NM_001289001 в NCBI) или TMPRSS6 яванского макака (аминокислоты 66-800, V673M из эталонной последовательности XM_005567384 в NCBI), при этом оба из них слиты с N-концевым 8 х гистидином. Для биоанализа CM антитела инкубировали либо с 0,2% hTMPRSS6 CM, либо с 0,75% mfTMPRSS6 CM при 25°C в течение 30 минут, при этом все проценты CM выражали как % объем/объем.

[0208] Второй биоанализ («биоанализ HEK293») проводили с клеточными линиями HEK293/hTMPRSS6, HEK293/mfTMPRSS6 и HEK293/mTMPRSS6, которые стабильно экспрессируют TMPRSS6 человека, яванского макака и мыши соответственно. Подробности о получении этих клеточных линий можно найти в примере 5. Для биоанализа HEK293 клетки высевали по 10000 клеток/лунка (для 30-минутной преинкубации) и 20000 клеток/лунка (для преинкубации в течение ночи) в 96-луночный планшет в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы+10% FBS+Pen/Strep/L-глутамин (полная среда DMEM) и инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Для биоанализа клеток HEK293 с 30-минутной преинкубацией на следующий день после посева клеток среду удаляли из клеток, все клетки один раз промывали аналитическим буфером, к клеткам добавляли антитела и инкубировали при 25°C в течение 30 минут. В условиях предварительной инкубации в течение ночи, на следующий день после посева клеток, к клеткам, все еще находящимся в полной среде DMEM, без промывания добавляли антитела и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день среду (включая антитела) удаляли из клеток, и все клетки один раз промывали аналитическим буфером.

[0209] По завершении инкубаций антитела/TMPRSS6 и промывания планшета для всех анализов 150 мкМ флуоресцентного пептидного субстрата TMPRSS6 (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Enzo BML-P237), растворенного в аналитическом буфере, к антителу добавляли обработанные клетки или смесь CM/антитела и инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 5% CO₂. После инкубации в течение 1 часа флуоресценцию измеряли на планшет-ридере Envision (Perkin Elmer) с длиной волны возбуждения 380 нм и длиной волны излучения 460 нм. Результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистика) с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad) для получения значений IC₅₀. Процент ингибирования рассчитывали по значениям RFU (относительные единицы флуоресценции) с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ ингибирования} = 100 \times \frac{RFU_{\text{исходный уровень}} - RFU_{\text{ингибирование}}}{RFU_{\text{исходный уровень}} - RFU_{\text{фон}}}$$

[0210] В этом уравнении «RFU_{исходный уровень}» представляет собой значение флуоресценции либо от определенной концентрации TMPRSS6 CM, либо от определенного количества клеток HEK293/TMPRSS6 без антител, «RFU_{ингибирование}» представляет собой значение флуоресценции при максимальной концентрации конкретного антитела с вышеупомянутой концентрацией TMPRSS6 CM или определенном количестве клеток HEK293/TMPRSS6, а «RFU_{исходный уровень}» представляет собой значение флуоресценции без каких-либо клеток TMPRSS6 CM или HEK293/TMPRSS6.

Результаты

[0211] Семь антител к TMPRSS6 отбирали и тестировали в отношении их способности ингибировать ферментативную активность клеток TMPRSS6 CM и HEK293/TMPRSS6. В таблицах 14-16 показаны результаты этих экспериментов.

Таблица 14. Ингибирование TMPRSS6 CM антителами к TMPRSS6

Постоянная концентрация TMPRSS6 CM	0,2% hTMPRSS6 CM		0,75% mfTMPRSS6 CM	
	% ингибировани	IC ₅₀ [M]	% ингибировани	IC ₅₀ [M]
REGN7969	71	>1,0E-08	66	>5,0E-08
REGN7971	65	>1,0E-08	68	>5,0E-08
REGN7973	93	2,6E-08	81	>5,0E-08
REGN7974	85	4,0E-07	69	>5,0E-08
REGN7977	94	2,3E-08	89	5,0E-08
REGN7999	98	3,0E-09	98	1,7E-09
REGN8023	98	7,1E-10	98	7,4E-10
Контроль подкласса hIgG	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует

[0212] Как показано в таблице 14, все из выбранных антител показали ингибирование, составляющее около 0,2% hTMPRSS6 CM, в диапазоне от около 65% до около 98%, при этом значения IC₅₀ находились в диапазоне от около 710 пМ до более около 10 нМ. Все из антител, раскрытые в данном документе, также продемонстрировали ингибирование около 0,75% mfTMPRSS6 CM в диапазоне от около 66% до около 98%, при этом значения IC₅₀ находились в диапазоне от около 740 пМ до более около 50 нМ.

Таблица 15. Ингибирование антителами к TMPRSS6 клеток HEK293/TMPRSS6 с помощью преинкубации в течение 30 минут при 25°C

10000 клеток/лунка с преинкубацией с антителами в течение 30 минут при 25°C						
Соединения HEK293/TMPRSS6	hTMPRSS6		mfTMPRSS6		mTMPRSS6	
	% ингибирования	IC ₅₀ [M]	% ингибирования	IC ₅₀ [M]	% ингибирования	IC ₅₀ [M]
REGN7969	87	1,9E-09	87	8,8E-09	ингибирована	ингибиро

					ние отсутствует	вание отсутствует
REGN7971	86	9,7E-10	87	3,1E-09	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует
REGN7973	89	5,8E-09	85	2,5E-08	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует
REGN7974	86	5,1E-09	81	3,0E-08	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует
REGN7977	86	3,6E-09	87	8,1E-09	58	3,5E-08
REGN7999	86	3,0E-09	90	6,5E-09	88	3,6E-09
REGN8023	90	3,6E-10	94	6,6E-10	82	1,5E-09
Контроль подкласса hIgG	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует

[0213] Как показано в таблице 15, когда антитела предварительно инкубировали в течение 30 минут с 10000 клетками HEK293/TMPRSS6, все из выбранных антител продемонстрировали ингибирование клеток HEK293/hTMPRSS6 в диапазоне от около 86% до около 90%, при этом значения IC_{50} находились в диапазоне от около 360 пМ до около 5,8 нМ. Все из выбранных антител также продемонстрировали ингибирование клеток HEK293/mfTMPRSS6 в диапазоне от около 81% до около 94%, при этом значения IC_{50} находились в диапазоне от около 660 пМ до около 30 нМ. Три из выбранных антитела (REGN7977, REGN7999, REGN8023) продемонстрировали ингибирование клеток HEK293/mTMPRSS6 в диапазоне от около 58% до около 88%, при этом значения IC_{50} для ингибирующих антител находились в диапазоне от около 1,5 нМ до около 35 нМ.

Таблица 16. Ингибирование антителами к TMPRSS6 клеток HEK293/TMPRSS6 с помощью преинкубации в течение ночи при 37°C

20000 клеток/лунка с преинкубацией с антителами в течение ночи при 37°C			
Соединения	hTMPRSS6	mfTMPRSS6	mTMPRSS6

HEK293/TMPRSS6						
mAb	% ингибирования	IC₅₀ [M]	% ингибирования	IC₅₀ [M]	% ингибирования	IC₅₀ [M]
REGN7969	88	1,2E-09	89	1,3E-08	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует
REGN7971	90	1,4E-09	89	6,0E-09	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует
REGN7973	88	2,2E-09	42	> 1,0E-08	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует
REGN7974	86	2,6E-09	31	> 1,0E-08	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует
REGN7977	87	1,7E-09	81	> 1,0E-08	97	1,4E-08
REGN7999	89	2,1E-09	91	2,1E-08	103	2,1E-09
REGN8023	90	1,1E-09	91	2,8E-09	98	1,2E-09
Контроль подкласса hIgG	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует	Ингибирование отсутствует

[0214] Как показано в таблице 16, когда антитела предварительно инкубировали в течение ночи с 20000 клетками HEK293/TMPRSS6, все из выбранных антител продемонстрировали ингибирование клеток HEK293/hTMPRSS6 в диапазоне от около 86% до около 90%, при этом значения IC₅₀ находились в диапазоне от около 1,1 нМ до около 2,6 нМ. Все выбранные антитела также продемонстрировали ингибирование клеток HEK293/mfTMPRSS6 в диапазоне от около 31% до около 91%, при этом значения IC₅₀ находились в диапазоне от около 2,8 нМ до более чем около 10 нМ. Три из выбранных антитела (REGN7977, REGN7999, REGN8023) продемонстрировали ингибирование клеток HEK293/mTMPRSS6 в диапазоне от около 97% до около 103%, при этом значения IC₅₀ для ингибирующих антител находились в диапазоне от около 1,2 нМ до около 14 нМ. Контроль подкласса IgG не продемонстрировал какого-либо измеримого ингибирования TMPRSS6 ни в одном из тестируемых форматов.

Пример 8. Картирование эпитопов TMPRSS6 человека с помощью HDX-MS

Экспериментальная процедура

[0215] Масс-спектрометрию с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS) проводили для определения аминокислотных остатков TMPRSS6 человека, которые взаимодействуют с подгруппой моноклональных антител к TMPRSS6 по настоящему изобретению, REGN7999 и REGN8023. Общее описание метода HDX-MS изложено, например, Ehring, *Analytical Biochemistry* (1999) 267(2):252-259; и Engen and Smith, *Anal. Chem.* (2001) 73:256A-265A.

[0216] Эксперименты на основе HDX-MS проводили на специализированной платформе, состоящей из специальной системы автоматизации HDX для маркировки и гашения дейтерия, Waters Acquity Binary Solvent Manager для расщепления и загрузки образцов, другого Waters Acquity Binary Solvent Manager для аналитического градиента, и масс-спектрометра Thermo Q Exactive HF для идентификации пептидов и измерения массы.

[0217] Раствор для мечения D₂O готовили в виде буфера PBS в D₂O при рD 7,0 (10 mM фосфатный буфер, 140 mM NaCl и 3 mM KCl, что эквивалентно рН 7,4 при 25°C). Для мечения дейтерием 10 мкл рекомбинантного внеклеточного домена TMPRSS6 человека, экспрессируемого с мутацией S762A и C-концевой меткой тус-тус-гексагистидина (обозначаемой hTMPRSS6_S762A-MMH; REGN5330; SEQ ID NO: 117), предварительно смешанного либо с REGN7999, либо с REGN8023, инкубировали при 20°C с 90 мкл раствора для мечения D₂O в разные временные точки в двух повторностях (недейтерированный контроль - 0 минут; мечение дейтерием - 5 минут или 10 минут). Реакционную смесь для дейтерирования гасили добавлением 90 мкл гасящего буфера (0,5 M TCEP-HCl, 4 M мочевины и 0,5% муравьиной кислоты) к каждому образцу для инкубации в течение 90 секунд при 20°C. Затем охлажденные образцы вводили в систему LC для расщепления онлайн пепсином/протеазой XIII. Расщепленные пептиды улавливали колонкой C18 (2,1 мм x 5 мм, Waters) и разделяли на другой колонке C18 (2,1 мм x 50 мм, Waters) при -5°C с 20-минутным градиентом от 0% до 90% В (подвижная фаза А: 0,5% муравьиной кислоты и 4,5% ацетонитрила в воде, подвижная фаза В: 0,5% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Элюированные пептиды анализировали с помощью масс-спектрометрии Thermo Q Exactive HF в режиме LC-MS/MS или LC-MS.

[0218] Данные LC-MS/MS недейтерированных образцов hTMPRSS6_S762A-MMH анализировали по базе данных, включающей аминокислотные последовательности белка TMPRSS6 человека, пепсина, протеазы XIII и их обратные последовательности, используя поисковую систему Byonic (Protein Metrics). Параметры поиска устанавливали по умолчанию с использованием неспецифического ферментативного расщепления и человеческого гликозилирования в качестве модификации общей переменной. Перечень идентифицированных пептидов затем импортировали в программное обеспечение HDExaminer 3.1 (Sierra Analytics) для расчета поглощения дейтерия ($D_{\text{поглощение}}$) и процента поглощения дейтерия (%D) для всех дейтерированных образцов. %D рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Процент поглощения дейтерия (\%D)} = \frac{D_{\text{поглощения}} f \text{ или пептид в каждой точке времени} \times 100\%}{\text{Максимум } D_{\text{поглощения}} \text{ пептида}}$$

Результаты

[0219] Всего идентифицировали 294 пептида из TMPRSS6 человека как из hTMPRSS6_S762A-ММН в отдельности, так и из hTMPRSS6_S762A-ММН в комплексе с образцами REGN7999, что составляет около 79,2% покрытия последовательности TMPRSS6 человека. Любой пептид, продемонстрировавший снижение процента поглощения дейтерия, составляющее 5% или более, определяли как значительно защищенный ($\Delta\%D < -5\%$).

[0220] В таблице 17 показаны пептиды TMPRSS6 человека со значительной защитой при образовании комплекса hTMPRSS6_S762A-ММН-REGN7999 по сравнению с hTMPRSS6_S762A-ММН в отдельности. Пептиды, соответствующие аминокислотам 693-703 SHFFEPGLHCW (SEQ ID NO: 120) и 780-805 LVSWGLGCGRPNYFGVYTRITGVISW (SEQ ID NO: 121) на TMPRSS6 человека, были значительно защищены REGN7999.

Таблица 17. Пептиды TMPRSS6 человека со значительной защитой REGN7999

TMPRSS6 человека	5 мин			10 мин			Δ%D
	hTMPRSS6-REGN7999	hTMPRSS6	ΔD	hTMPRSS6-REGN7999	hTMPRSS6	ΔD	
Остатки*	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	Δ%D
693-698	0,42	0,61	-0,19	0,37	0,62	-0,25	-8,2
693-703	0,85	1,08	-0,23	0,53	1,15	-0,62	-5,9
695-703	0,39	1,18	-0,79	0,4	1,16	-0,76	-14,4
780-798	5,41	6,14	-0,73	5,3	6,18	-0,88	-5,6
781-783	0,32	0,40	-0,08	0,32	0,39	-0,07	-8,3
781-796	4,89	5,61	-0,72	4,91	5,59	-0,68	-6,0
781-798	5,30	6,04	-0,74	5,35	6,00	-0,65	-5,1
784-796	3,18	3,66	-0,48	3,14	3,59	-0,45	-5,2
792-798	0,43	0,79	-0,36	0,43	0,77	-0,34	-7,7
793-798	0,45	0,63	-0,18	0,44	0,66	-0,22	-5,5
797-805	2,15	2,56	-0,41	2,12	2,53	-0,41	-6,5

*Нумерация последовательности соответствует номеру доступа NP_705837.1 в NCBI

[0221] Всего идентифицировали 302 пептида из TMPRSS6 человека как из hTMPRSS6 S762A-ММН в отдельности, так и из hTMPRSS6 S762A-ММН в комплексе с

образцами REGN8023, что составляет около 79,6% покрытия последовательности TMPRSS6 человека. Любой пептид, продемонстрировавший снижение процента поглощения дейтерия, составляющее 5% или более, определяли как значительно защищенный ($\Delta\%D < -5\%$).

[0222] В таблице 18 показаны пептиды TMPRSS6 человека со значительной защитой при образовании комплекса hTMPRSS6 S762A-ММН-REGN8023 по сравнению с hTMPRSS6 S762A-ММН в отдельности. Пептиды, соответствующие аминокислотам 125-133 LITSTRLGT (SEQ ID NO: 122), 586-594 GEWPWQASL (SEQ ID NO: 123), 626-650 STVLWTVFLGKQVWQNSRWPGEVSFK (SEQ ID NO: 124) и 704-724 ITGWGALREGGPISNALQKVD (SEQ ID NO: 125) на TMPRSS6 человека, были значительно защищены REGN8023.

Таблица 18. Пептиды TMPRSS6 человека со значительной защитой REGN8023

TMPRSS6 человека	5 мин			10 мин			
	hTMPRSS6-REGN8023	hTMPRSS6		hTMPRSS6-REGN8023	hTMPRSS6		
Остатки*	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	$\Delta\%D$
125-131	1,73	2,02	-0,29	1,73	1,98	-0,25	-6,0
125-133	2,59	3,03	-0,44	2,61	2,99	-0,38	-6,5
126-133	2,51	2,92	-0,41	2,56	2,90	-0,34	-6,9
586-589	0,07	0,15	-0,08	0,08	0,14	-0,06	-7,7
586-594	0,60	0,93	-0,33	0,60	0,93	-0,33	-6,2
626-630	1,51	1,66	-0,15	1,53	1,65	-0,12	-5,2
628-630	0,03	0,18	-0,15	0,03	0,16	-0,13	-15,4
628-631	0,04	0,15	-0,11	0,06	0,14	-0,08	-5,2
628-633	0,08	0,28	-0,20	0,10	0,29	-0,19	-5,4
634-639	1,93	2,45	-0,52	1,92	2,45	-0,53	-14,6
634-642	3,46	4,04	-0,58	3,47	4,00	-0,53	-8,9
634-644	3,84	4,44	-0,60	3,87	4,41	-0,54	-7,9
634-646	4,81	5,38	-0,57	4,84	5,35	-0,51	-6,0
634-649	5,99	6,63	-0,64	6,02	6,59	-0,57	-5,2
634-650	6,15	6,94	-0,79	6,24	6,92	-0,68	-5,9
704-710	1,50	1,83	-0,33	1,51	1,84	-0,33	-7,2
704-711	2,32	2,69	-0,37	2,34	2,68	-0,34	-6,6
704-713	3,22	3,61	-0,39	3,20	3,57	-0,37	-5,3

704-718	3,88	5,37	-1,49	3,94	5,31	-1,37	-13,2
704-719	4,56	5,99	-1,43	4,50	6,02	-1,52	-12,6
704-720	4,89	6,87	-1,98	4,79	6,91	-2,12	-16,3
711-720	2,28	3,72	-1,44	2,32	3,67	-1,35	-22,2
711-724	3,52	5,68	-2,16	3,64	5,60	-1,96	-20,8
714-724	2,86	4,70	-1,84	2,88	4,62	-1,74	-22,1

***Нумерация последовательности соответствует номеру доступа NP_705837.1 в NCBI**

Пример 9. Картирование эпитопов TMPRSS6 человека с помощью CryoEM

Экспериментальная процедура

[0223] Криоэлектронную микроскопию (CryoEM) использовали для дополнительной характеристики эпитопов, соответствующих выбранным антителам к TMPRSS6.

[0224] Для получения Fab-фрагментов IgG REGN7999 и REGN8023 расщепляли на F(ab')²- и Fc-фрагменты с использованием фермента Fabricator (Genovis) в соответствии со стандартными протоколами производителя. F(ab')² восстанавливали до Fab с использованием 2-меркаптоэтиламина (2-MEA, ThermoFisher) с последующим удалением Fc-фрагмента с использованием аффинной смолы CaptureSelect IgG-Fc (ms) (ThermoFisher). Fab-фрагменты дополнительно очищали путем инъекции в колонку для эксклюзионной хроматографии (SEC) (Superdex 200 Enhance 15/300 GL, GE Healthcare), соединенную с хроматографической системой АКТА Avant 25 (GE Healthcare). Рабочий буфер содержал 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl. Пиковые фракции объединяли и концентрировали в центробежном фильтре с граничным значением 30 кДа (Millipore Sigma) для последующего использования при получении комплекса.

[0225] Белок TMPRSS6 человека, используемый в этом эксперименте, содержит остатки внеклеточного домена G77-T811 TMPRSS6 человека, слитые с C-концевой меткой Мус-Мус-гексагистидина, и содержит мутацию в каталитическом домене (S762A), которая делает белок каталитически неактивным (обозначаемым TMPRSS6_S762A-ММН человека). Для образования комплекса 200 мкг очищенного TMPRSS6_S762A-ММН человека смешивали с 250 мкг каждого из Fab REGN7999 и Fab REGN8023, а затем инкубировали на льду в течение примерно 30 минут. Смесь вводили в колонку SEC (Superdex 200 Enhance 15/300 GL, GE), соединенную с хроматографической системой АКТА Avant 25 (GE Healthcare). Рабочий буфер для SEC содержал 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl. Фракции одного моодисперсного пика, соответствующие комплексу TMPRSS6 S762A-ММН человека - Fab REGN7999 - Fab REGN8023, объединяли и концентрировали в центробежном фильтре с граничным значением 30 кДа (Millipore Sigma) до концентрации 3,5 мг/мл, измеренной с помощью прибора Nanodrop (ThermoFisher).

[0226] Подготовку образцов CryoEM и сбор данных проводили следующим

образом. Свежеочищенный комплекс TMPRSS6_S762A-ММН человека -- Fab REGN7999 - Fab REGN8023 разводили в два раза до 1,75 мг/мл в буфере, содержащем 25 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl для приготовления cryoEM-решетки. n-Додецил-b-D-мальтопиранозид (Anatrace) добавляли до конечной концентрации ~60 мкМ непосредственно перед пипетированием 3,5 мкл смеси на UltrAufoil R1.2/1.3, решетка 300 меш (Quantifoil). Избыточную жидкость удаляли с помощью фильтровальной бумаги и решетку замораживали погружением в жидкий этан, охлаждаемый жидким азотом, с использованием Vitrobot Mark IV (ThermoFisher), функционирующего при 4°C и влажности 100%. Затем решетку вставляли в микроскоп Titan Krios G3i (ThermoFisher), оснащенный камерой K3 (Gatan). В счетном режиме собирали 3580 кинофрагментов при номинальном увеличении 81000x (размер пикселя 0,85 Å). Каждый кинофрагмент содержал 46 фракций дозы в течение 2-секундной экспозиции, а общая полученная доза на Å² составляла ~40 электронов.

[0227] Обработку данных CryoEM и создание карты выполняли следующим образом. Данные CryoEM первоначально обрабатывали с использованием Cryosparc v2.14.2. В кинофрагментах движение корректировали с помощью коррекции движения Patch, а параметры CTF оценивали с помощью оценки Patch CTF. Частицы изначально выбирали с помощью средства выбора Blob для создания средних 2D-классов для выбора матрицы. С помощью средства выбора матрицы выбирали 927835 частиц. После 2D-классификации, изначальной реконструкции и гетерогенной детализации идентифицировали 94036 частиц, соответствующих комплексу REGN5330 -- Fab REGN7999 -- Fab REGN8023. Эти частицы детализировали до реконструкции разрешения 3,4 Å с использованием неравномерной детализации. Полученную карту использовали в качестве исходной эталонной модели для 3D-классификации в Relion. Карту, используемую для построения модели, рассчитывали с использованием конвейера обработки одиночных частиц Relion версии 3.1. Кинофрагменты корректировали с помощью MotionCor2, а параметры CTF оценивали с помощью gctf. Для дальнейшей обработки отбирали 3411 выровненных микрофотографий на основании оценки разрешения CTF выше 4 Å. 1445534 частицы отбирали из микрофотографий с использованием 2D-автоматического выбора на основе матрицы и извлекали в виде 3-кратных изображений частиц (2,55 Å на пиксель). Проводили три раунда 2D-классификации для удаления ложноположительных результатов и нарушенных или неполных комплексов, в результате чего получали 1034494 частицы. Эти частицы подвергали 3D-классификации по 8 классам с использованием исходной эталонной модели, рассчитанной в CryoSparc. 270021 частицу из двух лучших классов, соответствующих комплексу TMPRSS6 S762A-ММН человека -- Fab REGN7999 -- Fab REGN8023, повторно извлекали в виде несвязанных изображений частиц и подвергали 3D-детализации, в результате чего получали карту с разрешением 3,4 Å, на которой показаны Fab и каталитические домены с высоким разрешением, но остальные N-концевые домены белка были изображены со слабым разрешением. Для лучшего

разрешения N-концевых доменов целенаправленную классификацию проводили без выравнивания с применением мягкой маски, исключаящей Fab и каталитический домен. Идентифицировали единственный класс, содержащий 146035 частиц, имеющий улучшенную плотность N-концевых доменов. Уточнение этих частиц приводило к получению карты с разрешением 3,6 Å. За двумя раундами CtfRefine и байесовской полировки последовали три дополнительных целенаправленных 3D-классификации без выравнивания, в которых применяли мягкие маски, окружающие домены CUB и SEA, в результате чего получали окончательный набор из 105142 частиц. Затем эти частицы уточняли до карты с разрешением 3,3 Å (FSC=0,143) с улучшенными характеристиками в N-концевых доменах. Для построения модели карту фильтровали до локальных значений разрешения, рассчитанных в Relion, и усиливали до коэффициента B -76 Å².

[0228] Построение и уточнение модели осуществляли следующим образом. Построение модели вручную осуществляли с использованием Coot версии 0.8.9, а детализацию в реальном пространстве выполняли в Phenix версии 1.17. Модель гомологии мутанта S762A каталитического домена TMPRSS6 человека создавали на основе опубликованной кристаллической структуры каталитического домена матриптазы-1 человека (PDB 4IS5) с использованием программы Sculptor в Phenix. Эту модель состыковывали с cryoEM-картой комплекса TMPRSS6 S762A-ММН человека -- Fab REGN7999 - Fab REGN8023 с помощью Phenix AutoDock и корректировали вручную. Домены LDLRa встраивали в плотность вручную с использованием опубликованной кристаллической структуры домена LDLR (PDB 1AJJ) в качестве ориентира. Построение доменов CUB 1 и 2 вручную основывалось на опубликованной кристаллической структуре кубилина (PDB 3KQ4). Правильный регистр последовательности подтверждали плотностью боковых цепей объемных остатков и N-связанными гликозилированиями, а также положением дисульфидных мостиков. N-концевой домен SEA не строили вследствие невысокой плотности фрагментации. Текущая модель включает остатки 212-811 TMPRSS6 человека, за исключением остатков 573-581 и 662-664, которые расположены в неупорядоченных линкерах. Модели гомологии для Fab-фрагментов REGN7999 и REGN8023 создавали на основе ранее определенной структуры Fab REGN. Однозначной состыковке моделей Fab с их соответствующими плотностями способствовали четко интерпретируемые плотности боковых цепей, соответствующие их различным последовательностям CDR. После состыковки модели корректировали вручную с последующей доработкой в реальном пространстве всего комплекса TMPRSS6 S762A-ММН человека -- Fab REGN7999 -- Fab REGN8023.

Результаты

[0229] *CryoEM-структура комплекса TMPRSS6 S762A-ММН человека -- Fab REGN7999 - Fab REGN8023*: для лучшего понимания того, как антитела к TMPRSS6 связываются и ингибируют TMPRSS6, белковый комплекс, состоящий из каталитически неактивного эктодомена TMPRSS6 человека (TMPRSS6 S762A-ММН человека), связанный с Fab-фрагментами антител к TMPRSS6 REGN7999 и REGN8023, выделяли

методом SEC, и его трехмерную структуру определяли с помощью одночастичной CryoEM. При общем разрешении 3,3 Å реконструкции CryoEM было достаточно для построения атомной модели ~80% эктодомена TMPRSS6 человека, включая его два домена CUB, три домена LDLRa и домен каталитической сериновой протеазы. Реконструкция также позволяла однозначно стыковать Fab-фрагменты REGN7999 и REGN8023 и вручную повторно подгонять их переменные области. Локальное разрешение на границе раздела паратоп-эпитоп обоих Fab колеблется в пределах 3,1-3,5 Å, что позволяет точно определять взаимодействия на уровне остатков между антителами и TMPRSS6. Структура третичного комплекса также подтверждает, что REGN7999 и REGN8023 связываются с неперекрывающимися эпитопами.

[0230] *Эпитоп REGN7999 и структурный механизм ингибирования:* остатки, способствующие образованию эпитопа REGN7999 на TMPRSS6, обобщены в таблице 18. Эти остатки определяли как остатки TMPRSS6 с неводородными атомами, которые находятся в пределах 4 Å от неводородных атомов REGN7999 и могут включать водородные связи, взаимодействия типа заряд-заряд или гидрофобные/ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Эпитоп REGN7999 можно разделить на два участка на TMPRSS6. Первый участок расположен на каталитическом домене и состоит из остатков TMPRSS6 G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 и N791. Контакты на этом участке опосредуются CDR H3, L2, L3 и одним остатком из каркасной области (FR) L3. Второй участок расположен в домене 2 повтора LDLRa и состоит из остатков V490, S501, T502, C503, I504, S505 и K508. Паратоп второго участка состоит из непрерывного участка остатков легкой цепи, охватывающего части CDR-L2 и FR-L3. Домены CUB и домен SEA удалены на большое расстояние от границы раздела связывания REGN7999 и не способствуют образованию его эпитопа на TMPRSS6. Данные масс-спектрометрических экспериментов по водородно-дейтериевому обмену (HDX) на REGN7999 (пример 8) в целом согласуются с участком каталитического домена, наблюдаемым в структуре CryoEM, но не указывают на остатки домена 2 LDLRa, способствующие образованию эпитопа.

[0231] Хотя его эпитоп включает участок каталитического домена, REGN7999 не контактирует с триадой каталитических сайтов (H617, D668 и S672), где происходит расщепление, и не ориентирован так, что стерически перекрывает доступ субстрата к активному сайту. Местоположение субстрата, связанного с TMPRSS6, экспериментально не определено, но это местоположение можно предположить на основании гомологичной структуры домена сериновой протеазы матриптазы в комплексе с пептидным ингибитором, о которой сообщалось Yuan et al, *BMC Struct Biol.* (2011) 11:30. Эти структурные наблюдения позволяют предположить, что связывание растворимого гемоювелина с эктодоменом TMPRSS6 не нарушается присутствием REGN7999. Не привязываясь к какой-либо теории, возможно, что REGN7999 может ингибировать TMPRSS6, аллостерически «захватывая» TMPRSS6 в неактивной конформации, которая способна связывать, но не расщеплять субстрат.

[0232] *Эпитоп REGN8023 и структурный механизм ингибирования:* остатки, способствующие образованию эпитопа REGN8023 на TMPRSS6, обобщены в таблице 19. Эти остатки определяли как остатки TMPRSS6 с неводородными атомами, которые находятся в пределах 4 Å от неводородных атомов REGN8023 и могут включать водородные связи, взаимодействия типа заряд-заряд или гидрофобные/ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Эпитоп REGN8023 расположен исключительно в каталитическом домене и состоит из остатков TMPRSS6 R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715 и I716. Эпитоп, наблюдаемый в этой структуре, в целом согласуется с данными экспериментов по масс-спектрометрии HDX. Паратоп REGN8023 в основном состоит из тяжелой цепи и содержит CDR H1, H2, H3, L1, L3, а также FR-H3.

[0233] REGN8023 связывает каталитический домен TMPRSS6 так, что тяжелая цепь не контактирует напрямую с каталитической триадой, но оказывается в положении, которое перекрывает доступ субстрата к активному сайту, на основании модели, описанной выше. Не привязываясь к какой-либо теории, возможно, что REGN8023 ингибирует TMPRSS6 за счет стерических затруднений связывания субстрата с активным сайтом. Об этом также свидетельствуют данные связывания, демонстрирующие, что REGN8023 конкурирует с растворимым гемоувелином за связывание с белком эктодомена TMPRSS6.

Таблица 19. Эпитопы антител к TMPRSS6. Остатки эпитопа определяются как аминокислоты с неводородными атомами в пределах 4 Å от неводородных атомов антитела.

Антитело	Остатки эпитопа TMPRSS6*	
	Домен 2 LDLRa	Каталитический домен
REGN7999	V490, S501, T502, C503, I504, S505, K508	G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752, N791
REGN8023	н/п	R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715, I716

*Нумерация последовательности соответствует номеру доступа NP_705837.1 в NCBI

Пример 10. Сравнение REGN7999 и REGN8023 у самок мышей WT

Экспериментальная процедура

[0234] Проводили два эксперимента *in vivo* для анализа воздействия выбранных антител TMPRSS6 на сывороточный гепсидин и сывороточное железо. В обоих исследованиях использовали самок мышей дикого типа с гуманизированным HJV (исследование 1: возраст 11-13 недель и исследование 2: возраст 6-9 недель). В обоих исследованиях у мышей предварительно брали кровь в день 7. В первом исследовании (исследование 1) мышам подкожно вводили два выбранных антитела к TMPRSS6,

REGN7999 и REGN8023, а также антитело изотипического контроля в дозе 10 мг/кг в дни исследования 0, 2 и 7 дни. Затем в день 9 мышей забирали и собирали терминальную кровь для анализа. Во втором исследовании (исследование 2) те же два антитела к TMPRSS6, REGN7999 и REGN8023, а также антитело изотипического контроля вводили мышам подкожно в дозе 25 мг/кг в дни исследования 0, 2 и 7. Затем в день 14 мышей забирали и собирали терминальную кровь для анализа.

[0235] В обоих исследованиях сывороточное железо измеряли в терминальной крови с использованием прибора Siemens ADVIA Chemistry XPT. Сывороточный гепсидин измеряли в терминальной крови с использованием набора для ELISA для определения конкуренции гепсидина мышей (Intrinsic Lifesciences, кат. номер: HMC-001, партия: 5142019) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

[0236] Измерения сывороточного железа (выраженные в нг/мл) и сывороточного гепсидина (выраженные в мкг/дл) из исследования 1 показаны в таблице 20, а из исследования 2 показаны в таблице 21. □

Таблица 20. Уровни сывороточного железа и гепсидина у гуманизированных мышей HJV в ответ на обработку антителами к TMPRSS6 в исследовании 1 (10 мг/кг)

Измерение	Ab изотипического контроля	REGN7999	REGN8023
Сывороточный гепсидин (нг/мл), среднее±SD	390,2±175,4	652,0±175,4*	590±160,9
Сывороточное железо (мкг/дл), среднее±SD	148,8±37,78	79,63±18,15*	112±51,41

[0237] Как показано в таблице 20, в исследовании 1 обработка REGN7999 значительно повышала уровень сывороточного гепсидина и снижала содержание сывороточного железа у здоровых обработанных REGN7999 мышей по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем. Обработка REGN8023 также приводила к повышению сывороточного гепсидина и снижению сывороточного железа в у здоровых обработанных REGN8023 мышей, хотя это не было статистически значимым по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами. В таблице 20 все значения представляют собой среднее ± SD, n=6-8 на группу. Односторонний ANOVA; *p<0,05 по сравнению с Ab изотипического контроля.

Таблица 21. Уровни сывороточного железа и гепсидина у гуманизированных мышей HJV в ответ на обработку антителами TMPRSS6 в исследовании 2 (25 мг/кг)

Измерение	Ab изотипического	REGN7999	REGN8023
-----------	----------------------	----------	----------

	контроля		
Сывороточный гепсидин (нг/мл), среднее±SD	220,4±110,9	609,4±289,6*	363,4±108,1
Сывороточное железо (мкг/дл), среднее±SD	156,8±25,02	58,00±11,14*	86,00±17,77*

[0238] Как показано в таблице 21, в исследовании 2 обработка REGN7999 значительно повышала уровень сывороточного гепсидина и снижала содержание сывороточного железа у здоровых обработанных REGN7999 мышей по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем. Обработка REGN8023 также приводила к повышению сывороточного гепсидина и снижению сывороточного железа у обработанных REGN8023 здоровых мышей, хотя только уровни сывороточного железа достигали статистической значимости по сравнению с обработанными контрольным изотипом мышами. В таблице 21 все значения представляют собой среднее ± SD, n=4-5 на группу. Односторонний ANOVA; *p<0,05 по сравнению с Ab изотипического контроля.

[0239] Данные обоих исследований позволяют предположить, что выбранные антитела к TMPRSS6 способны блокировать функцию TMPRSS6, что приводит к наблюдаемым эффектам на уровни гепсидина и сывороточного железа.

Пример 11. Влияние антитела к TMPRSS6 на уровень железа в печени в мышинной модели гемохроматоза

[0240] Для дополнительного изучения эффективности антитела REGN7999 к TMPRSS6 в модели соответствующего заболевания проводили исследование наследственного гемохроматоза 1 типа. Наследственный гемохроматоз представляет собой заболевание, связанное с перегрузкой железом, вызванное мутацией белка HFE, которое приводит к неадекватно низким уровням гепсидина (Finberg et al. *Blood* (2011) 117(17):4590-4599).

Экспериментальная процедура

[0241] Самцов мышей, гомозиготных по делеции гена HFE мыши на 100% фоне C57BL/6 (обозначаемом HFE^{-/-}), использовали в качестве мышинной модели наследственного гемохроматоза 1 типа. Мышей HFE^{-/-} (n=5-7) еженедельно подкожно вводили 10 мг/кг контрольного изотипа или REGN7999, за исключением недели 1, когда вводили 2 инъекции. Включали контрольную группу мышей дикого типа, которой вводили изотипический контроль. Через 8 недель мышей подвергали эвтаназии с помощью асфиксии CO₂. Отбирали терминальную кровь и измеряли уровень сывороточного гепсидина с использованием набора для ELISA для определения конкуренции гепсидина мышей (Intrinsic Lifesciences, кат. номер: HMC-001, партия: 02032020) в соответствии с протоколом производителя. После умерщвления мышей их печень подвергали мгновенной заморозке. Позже эту печень обрабатывали для измерения содержания железа в печени на основе метода, описанного Torrance and Bothwell, *S. Afr. J. Med. Sci.* (1968) 33(1):9-11.

Результаты

[0242] Значения сывороточного гепсидина (указанные в нг/мл) и содержания железа в печени (указанные в мкг/г сухого веса) показаны в таблице 22.

Таблица 22. Влияние REGN7999 на сывороточный гепсидин и содержание железа в печени в мышинной модели наследственного гемохроматоза

	Мыши HFE^{+/+} (дикого типа) Обработка изотипическим контролем	Мыши HFE^{-/-} Обработка изотипическим контролем	Мыши HFE^{-/-} Обработка REGN7999
Сывороточный гепсидин (нг/мл)	364,8±96,89	339,3±150,7	1631±231,4* **
Содержание железа в печени (мг/г сухого веса)	338,4±60,03	771,1±68,37*	618,7±51,17* **

[0243] Как показано в таблице 22, через 8 недель обработки REGN7999 мыши HFE^{-/-} имели значимо повышенное содержание сывороточного гепсидина (около 1631 нг/мл) по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем (около 339,3 нг/мл). В таблице 22 также показано, что через 8 недель обработки REGN7999 мыши HFE^{-/-} имели значимо сниженное содержание железа в печени (около 618,7 мкг/г сухого веса) по сравнению с животными, обработанными изотипическим контролем (около 771,1 мкг/г сухого веса). В таблице 22 все значения представляют собой среднее ± SD, n=5-7 на группу. Односторонний ANOVA; *p<0,05 по сравнению с Изотипический контроль HFE^{+/+}; **p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем HFE^{-/-}.

Пример 12. Влияние антитела к TMPRSS6 в мышинной модели бета-талассемии

[0244] Для оценки эффективности двух антител к TMPRSS6, раскрытых в данном документе, проводили исследования в мышинной модели промежуточной бета-талассемии, нарушения, связанного с перегрузкой железом, связанного с неэффективным эритропоэзом и нарушением регуляции железа.

[0245] Мышей получали с гетерозиготной делецией генов $\beta 1$ и $\beta 2$, которые повторяют промежуточную бета-талассемию у людей (Ginzburg, *Blood* (2011) 118(16):4321-4330), и гомозиготной экспрессией гемоювелина человека (HJV) в месте HJV мыши (обозначаемых Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}) на фоне C57BL/6/129S6. Мышам Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (n=10-19) еженедельно подкожно вводили 10 мг/кг либо REGN7999, REGN8023, либо контрольного изотипа (за исключением недели 1, когда вводили 2 инъекции). Включали контрольную группу мышей дикого типа (WT), которой вводили изотипический контроль аналогичным образом. Через 8 недель мышей подвергали эвтаназии с использованием асфиксии CO₂, а цельную кровь собирали посредством пункции сердца и помещали в пробирки для серологического сбора крови с EDTA или без нее. Сывороточный гепсидин измеряли с использованием коммерчески доступного набора

для ELISA для определения конкуренции гепсидина мышей (Intrinsic Lifesciences, кат. номер: НМС-001, партия: 08232019) в соответствии с инструкциями производителя. Сывороточное железо и полная гематологическую панель, включая ретикулоциты и зрелые эритроциты (RBC), измеряли с использованием прибора Siemens ADVIA Chemistry XPT и гематологической системы Oxford Science GENESIS.

[0246] Кроме того, после умерщвления мышей их печень и селезенку подвергали быстрой заморозке до дальнейшей обработки. Образцы печени позже обрабатывали для измерения содержания железа в печени на основе метода, описанного Torrance and Bothwell, *S. Afr. J. Med. Sci.* (1968) 33(1):9-11. Селезенку измельчали и фильтровали через сито диаметром 70 мм в пробирку, содержащую 10 мл буфера autoMACS® (MilteNY Biotec, кат. номер: 130-091-221). Для сбора костного мозга из бедренных костей у мышей вырезали окончания тазобедренных суставов и помещали в пробирку, содержащую 100 мл буфера autoMACS®, дополненного бычьим сывороточным альбумином (BSA) (MilteNY Biotec, кат. номер: 130-091-376). Пробирки быстро вращали (10 с, 400 x g) для высвобождения костного мозга в раствор.

[0247] Клетки костного мозга и селезенки центрифугировали при 400 g в течение 10 минут при 4°C с последующей инкубацией с магнитными гранулами с антителом к CD45 мыши (MilteNY Biotec, кат. номер: 130-052-301) в течение 20 минут на льду. За этим следовала магнитная сепарация на колонках Multi-24 (MilteNY Biotec, кат. номер: 130-095-691). Фильтрат, обогащенный как зрелыми эритроцитами, так и предшественниками эритроцитов, собирали и инкубировали с блоком Fc к CD16/CD32 мыши (BD Biosciences, клон 2.4G2, кат. номер: 553142) в течение 10 минут. За этим следовала 30-минутная инкубация со следующими коммерческими антителами (все антитела крысы к антителам мыши): конъюгированное с FITC антитело к Ter119, клон TER-119, кат. номер: 557915; конъюгированное с APC антитело к CD44, клон IM7, кат. номер: 561862; конъюгированное с APC-Cy7 антитело к CD45, клон 30-F11, кат. номер: 557659; конъюгированное с APC-Cy7 антитело к CD11b, клон M1/70, кат. номер: 557657; и конъюгированное с APC-Cy7 антитело к Ly6G, клон 1A8, кат. номер: 560600; все от BD Biosciences.

[0248] AADvanced (Thermofisher, S10349) добавляли на 30 минут для исключения мертвых клеток из анализа. Все процедуры окрашивания проводили на льду, а компенсационные контроли включали с использованием OneComp eBeads™ (Invitrogen, кат. номер: 01-1111-42). Для правильного гейтирования целевых популяций готовили контрольную панель без одной. Образцы измеряли на проточном цитометре CytoFLEX LX (Beckman-Coulter) с использованием контролей флуоресценции без одного для гейтирования целевых популяций.

[0249] Как показано в таблице 23, через 8 недель обработки REGN7999 или REGN8023 у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} наблюдали значимо повышенные уровни сывороточного гепсидина (около 1510 нг/мл и около 1454 нг/мл соответственно) по сравнению как с мышами WT, так и с мышами Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}, обработанными

изотипическим контролем (около 225 нг/мл и около 511 нг/мл соответственно).

[0250] Кроме того, через 8 недель обработки REGN7999 или REGN8023 Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} имели значимое снижение (около 50 мкг/дл) сывороточного железа по сравнению с изотипическим контролем (около 128 мкг/дл, таблица 23). В группах изотипического контроля мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} накапливали больше железа в печени, чем мыши WT. Это повышение было более выраженным у самок мышей (от около 466 мкг/г до около 985 мкг/г сухого веса) по сравнению с самцами мышей (от около 215 мкг/г до около 364 мкг/г сухого веса) (таблица 23). Снижение содержания железа в печени в ответ на REGN7999 и REGN8023 также имело больший эффект у самок мышей через 8 недель обработки. В таблице 23 все значения представляют собой среднее \pm SD, n=10-19 на группу. Односторонний ANOVA; *p<0,01 по сравнению с изотипическим контролем WT; **p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем Hbb^{th3/+}.

Таблица 23. Влияние REGN7999 и REGN8023 на сывороточный гепсидин, сывороточное железо и содержание железа в печени в мышинной модели бета-талассемии

Группа обработки	Сывороточный гепсидин (нг/мл)	Сывороточное железо (мг/дл)	Содержание железа в печени (мг/г сухого веса) Когорта с самками	Содержание железа в печени (мг/г сухого веса) Когорта с самцами
Обработка изотипическим контролем мышей дикого типа	225 \pm 107	167 \pm 27	466 \pm 64	215 \pm 49
Мыши Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Обработка изотипическим контролем	511 \pm 232	128 \pm 31*	985 \pm 190*	364 \pm 123*
Мыши Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Обработка REGN7999	1510 \pm 911* **	51 \pm 23* **	718 \pm 177**	293 \pm 119
Обработка	1454 \pm 624* **	56 \pm 34* **	732 \pm 182**	264 \pm 79

REGN8023 мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}				
-------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--

[0251] Введение REGN7999 или REGN8023 мышам Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} приводило к повышению количества эритроцитов (около 10,51 М/мкл и около 10,18 М/мкл соответственно) по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем (около 8,72 М/мкл, соответственно; таблица 24). Восемь недель обработки REGN7999 или REGN8023 у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} приводили к снижению количества ретикулоцитов селезенки (с около 38% при изотипическом контроле до около 18%; Ter-119⁺/CD44^{high}) и повышению уровней зрелых RBC (Ter-119⁺/CD44^{low}) как в селезенке, так и в костном мозге, что указывает на улучшение эритропоэза и меньшую потребность во вторичном эритропоэзе в селезенке (таблица 25). Также наблюдали более значимое снижение массы селезенки у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}, обработанных антителом к Tmprss6 REGN7999 (около 0,142 г) или REGN8023 (около 0,130 г) по сравнению с изотипическим контролем (около 0,301 г) (таблица 24). В таблице 24 все значения представляют собой среднее ± SD, n=10-19 на группу. Односторонний ANOVA; *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем WT; **p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем Hbb^{th3/+}. В таблице 25 все значения представляют собой среднее ± SD, n=10-19 на группу. Односторонний ANOVA; *p<0,001 по сравнению с изотипическим контролем WT; **p<0,0001 по сравнению с изотипическим контролем Hbb^{th3/+}.

Таблица 24. Влияние REGN7999 и REGN8023 на эритроциты и массу селезенки в мышинной модели бета-талассемии

Группа обработки	Количество животных (n)	Эритроциты (М/мл)	Масса селезенки (г)
Обработка изотипическим контролем мышей дикого типа	16-19	10,05±0,87	0,076±0,014
Мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Обработка изотипическим контролем	15-16	8,72±0,27*	0,301±0,112*
Мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Обработка REGN7999	11-14	10,51±0,87**	0,142±0,053* **
Обработка REGN8023 мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}	10-13	10,18±0,47**	0,130±0,046**

Таблица 25. Влияние REGN7999 и REGN8023 на ретикулоциты и эритроциты костного мозга и селезенки в мышинной модели бета-талассемии

Группа обработки	Ретикулоциты костного мозга (% CD44 ^{high} Ter119 ⁺)	Зрелые эритроциты костного мозга (% CD44 ^{low} Ter119 ⁺)	Ретикулоциты селезенки (% CD44 ^{high} Ter119 ⁺)	Зрелые эритроциты селезенки (% CD44 ^{low} Ter119 ⁺)
Обработка изотипическим контролем мышей дикого типа	45,6±5,4	42,0±5,4	17,0±5,4	80,5±5,4
Мыши Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Обработка изотипическим контролем	48,1±10,5	25,8±11,6*	38,0±8,2*	51,0±13,5*
Мыши Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Обработка REGN7999	40,4±6,8	46,2±7,8**	18,1±3,2**	80,1±4,3**
Обработка REGN8023 мышей Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn}	41,5±9,4	45,7±10,1**	18,5±5,6**	78,2±7,9**

Пример 13. Влияние REGN7999 в мышечной модели бета-талассемии

[0252] Для дальнейшей оценки эффективности REGN7999, раскрытого в данном документе, проводили исследования в мышечной модели промежуточной бета-талассемии, как описано в примере 12.

[0253] Мышей получали с гетерозиготной делецией генов $\beta 1$ и $\beta 2$, которые повторяют промежуточную бета-талассемию у людей (Ginzburg, *Blood* (2011) 118(16):4321-4330), и гомозиготной экспрессией гомоювелина человека (HJV) в месте HJV мыши (обозначаемых Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}) на фоне C57BL/6/129S6. Мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (n=7-9; подробности получения этих мышей см. в примере 12) еженедельно подкожно инъецировали 5 мг/кг REGN7999 или контрольного изотипа (за исключением 2 инъекций, вводимых на неделе 1). Включали контрольную группу мышей дикого типа (WT), которой вводили изотипический контроль аналогичным образом. Через 8 недель

мышей обрабатывали и собирали образцы, как описано в примере 12. Сывороточный гепсидин, сывороточное железо и полную гематологическую панель, включая ретикулоциты и зрелые эритроциты, измеряли, как описано в примере 12.

[0254] Кроме того, после умерщвления мышей их печень мгновенно замораживали, а затем обрабатывали, как описано в примере 12. Значения сывороточного гепсидина (указанные в нг/мл) и содержания железа в печени (указанные в мкг/г сухого веса) показаны в таблице 26.

Таблица 26. Влияние REGN7999 на сывороточный гепсидин, сывороточное железо и содержание железа в печени в мышинной модели бета-талассемии

	Обработка изотипическим контролем мышей дикого типа	Мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Обработка изотипическим контролем	Мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Обработка REGN7999
Сывороточный гепсидин (нг/мл)	376,8±217,6	713,1±435,8	1781±1053* **
Сывороточное железо (мг/дл)	138,6±60,92	102,3±40,69	66,71±25,53*
Содержание железа в печени (мкг/г сухого веса)	372,1±83,96	547,2±162,7*	513,9±95,83

[0255] Как показано в таблице 26, через 8 недель обработки 5 мг/кг REGN7999 мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} имели значимое повышение (около 1781 нг/мл) уровней сывороточного гепсидина по сравнению как с мышами WT, так и с мышами Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}, обработанными изотипическим контролем (около 376,8 нг/мл и около 713,1 нг/мл соответственно). В таблице 26 также показано, что обработка REGN7999 приводила к значимому снижению (около 66 мкг/дл) сывороточного железа по сравнению с мышами Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}, обработанными изотипическим контролем (около 138 мкг/дл). В обработанных изотипическим контролем группах исследования наблюдали повышение содержания железа в печени с около 372 мкг/г сухого веса у мышей дикого типа до около 547 мкг/г сухого веса у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}. Хотя обработка REGN7999 не приводила к значимому снижению содержания железа в печени по сравнению с изотипическим контролем у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (около 513,9 и около 547,2 мкг/г сухого веса соответственно), значимое снижение наблюдали по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами дикого типа (таблица 26). В таблице 26 все значения представляют собой среднее ± SD, n=7-9 на; однофакторный ANOVA, *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем WT; **p<0,05 по сравнению с

изотипическим контролем Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}.

Таблица 27. Влияние REGN7999 на гематокрит, эритроциты и гемоглобин в мышинной модели бета-талассемии

	Обработка изотипическим контролем мышей дикого типа	Мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Обработка изотипическим контролем	Мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Обработка REGN7999
Гематокрит (%)	36,92±1,924	28,31±1,969*	30,57±3,216**
Эритроциты (М/мл)	9,52±0,81	8,93±0,68	11,2±0,51* **
Гемоглобин (г/дл)	13,02±0,73	9,22±0,54*	10,1±0,65* **

[0256] Как показано в таблице 27, гематокрит, количество эритроцитов и уровни гемоглобина были ниже у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}, обработанных изотипическим контролем, по сравнению с мышами дикого типа, как и ожидалось. Гематокрит снижался с около 37% у мышей дикого типа до около 28% у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}, обработанных 5 мг/кг контрольного изотипа. Обработка REGN7999 не продемонстрировала какого-либо эффекта по сравнению с изотипическим контролем на гематокрит у Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (таблица 27). Количество эритроцитов (указанное в М/мкл) повышалось с около 9,52 у мышей дикого типа до около 8,93 у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}, обработанных изотипическим контролем. Через 8 недель обработки REGN7999 у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} значительно повышалось количество эритроцитов до около 11,2 М мкл (таблица 27). У обработанных изотипическим контролем мышей дикого типа уровни гемоглобина составляли около 13 г/дл, и, как показано в таблице 27, обработка изотипическим контролем у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} значительно снижала уровень гемоглобина до около 9,22 г/дл. Обработка REGN7999 повышала уровни гемоглобина до около 10,1 г/дл через 8 недель обработки у мышей Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}. Не будучи связанными теорией, эти данные подтверждают идею о том, что ограничение содержания железа путем модуляции пути гепсидина оказывает благотворное влияние на эритроциты. В таблице 27 все значения представляют собой среднее ± SD, n=6-9 на; однофакторный ANOVA, *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем WT; **p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}.

Пример 14. Фармакокинетика (PK) и фармакодинамика (PD) у *яванского* макака

[0257] Целью данного исследования было определение фармакокинетических (PK) характеристик и фармакокинетических/фармакодинамических (PK/PD) взаимоотношений двух человеческих моноклональных антител (mAb) к TMPRSS6. В этом исследовании REGN7999 и REGN8023 вводили в виде однократной внутривенной (IV) инфузии самкам

яванских макак.

[0258] Как обобщено в таблице 28, 21 самку яванского макака относили к одной из 6 групп (n=3 или 4 животных на группу; группы с дозой 5 мг/кг или 15 мг/кг). Животные получали однократную IV инфузию 5 мг/кг REGN7999, 5 мг/кг REGN8023, 15 мг/кг REGN7999, 15 мг/кг REGN8023 или 15 мг/кг антитела изотипического контроля (таблица 28). Образцы крови для определения общих концентраций лекарственного средства собирали у всех животных перед введением дозы и в различные временные точки в течение 56-дневного периода жизни. Концентрации общего количества mAb человека в сыворотке крови определяли с использованием соответствующего определенным требованиям иммуноферментного анализа (ELISA) антитела к Fc человека. Параметры PK оценивали с помощью некомпартментного анализа (NCA). Образцы крови для оценки фармакодинамики собирали в различные временные точки на протяжении всего исследования и анализировали с использованием стандартного клинического химического анализа (анализатор Beckman Coulter AU680) и гематологического анализа (анализатор Avida 120). Сывороточный гепсидин измеряли с использованием коммерчески доступного набора для ELISA для определения конкуренции гепсидина мышей (Intrinsic Lifesciences, кат. номер: НМС-001, партия: 08232019) в соответствии с инструкциями производителя.

Таблица 28. Обобщенная информация о дозах и группах доз

№ группы	Тестируемый или контрольный препарат	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Количество животных
1	Антитело изотипического контроля	15	7,5	3
2	REGN7999	5	2,5	3
3	REGN7999	15	7,5	4
4	REGN8023	5	2,5	3
5	REGN8023	15	7,5	4

Примечание. Результаты и обсуждение сосредоточены только на PK/PD тестируемых препаратов REGN7999 и REGN8023 (группы 2-5).

[0259] PK профиль моноклональных антител (mAb) к TMPRSS6 REGN7999 или REGN8023 описывают нелинейной кинетикой, с опосредованным мишенью клиренсом (TMC) при низких концентрациях и линейной, пропорциональной дозе кинетикой, соответствующей насыщению опосредованного мишенью пути элиминации при высоких концентрациях mAb. После IV введения однократной дозы профили зависимости концентрации от времени REGN7999 и REGN8023 в совокупности характеризовались начальной короткой фазой распределения, за которой следовала короткая фаза линейного бета-элиминации, а при низких концентрациях - конечной нелинейной опосредованной

мишенью фазой элиминации и последующей опосредованной мишенью фазой элиминации. Никаких убедительных доказательств влияния антител к лекарственным препаратам (ADA) на профили и явного влияния на концентрацию обнаружено не было; таким образом, никакие значения концентрации не были исключены из анализа.

[0260] Фармакокинетические параметры указаны в таблице 29. После введения однократной IV дозы 5 и 15 мг/кг антитела наблюдали значения максимальной сывороточной концентрации (C_{max}), составляющие около 120 и около 410 мкг/мл соответственно для REGN7999, и наблюдали значения C_{max} , составляющие около 162 и около 508 соответственно для REGN8023. Соответствующие нормализованные в отношении дозы значения C_{max} ($C_{max}/\text{доза}$) находились в пределах около 1,4-кратного значения, что указывает на пропорциональное дозе повышение C_{max} с повышением IV дозы для mAb к TMPRSS6 REGN7999 и REGN8023. Среднее значение t_{max} (время, необходимое для достижения C_{max}), составляющее около 0,5 часа, первую измеряемую временную точку, наблюдали для всех групп дозы.

[0261] Концентрация (AUC_{inf}) REGN7999 повышалась более чем пропорционально дозе, при этом $AUC_{inf}/\text{доза}$ после введения 15 мг/кг REGN7999 была в около 1,6 раза выше, чем после введения дозы 5 мг/кг. В соответствии с этим, более высокий общий клиренс из организма (CL) наблюдали при дозе 5 мг/кг вследствие большего воздействия ТМС при более низких концентрациях. Воздействие REGN8023 повышалось пропорционально повышению дозы, что позволяет предположить более умеренный эффект ТМС в исследуемых дозах. Конечный период полужизни ($t_{1/2}$), представляющий ТМС во всех группах дозы, находился в диапазоне около 7-8 дней.

Таблица 29. Средние фармакокинетические параметры общего количества REGN7999 и общего количества REGN8023 после однократного внутривенного болюсного введения самкам яванских макак

Параметр	Единица	REGN7999				REGN8023			
		5 мг/кг (n=3)		15 мг/кг (n=4)		5 мг/кг (n=3)		15 мг/кг (n=4)	
		Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
C_{max}	мкг/мл	120	7,57	410	47,2	162	16,2	508	55,0
$C_{max}/\text{доза}$	(мкг/мл) / (мг/кг)	23,9	1,51	27,3	3,15	32,5	3,24	33,9	3,66
t_{max}	ч	0,500	0	0,500	0	0,500	0	0,500	0
AUC_{inf}	день•(мкг/мл)	831	153	3950	617	1440	182	4500	951
$AUC_{inf}/\text{доза}$	день•(мкг/мл) / (мг/кг)	166	30,7	263	41,2	289	36,4	300	63,4
CL	мл/день/кг	6,17	1,25	3,88	0,680	3,50	0,446	3,46	0,792
V_{ss}	мл/кг	57,2	1,31	57,6	6,65	37,7	2,41	42,8	7,02

Конечный t_{1/2}	день	8,10	0,592	7,74	0,949	7,49	0,577	7,39	2,09
-------------------------------------------	------	------	-------	------	-------	------	-------	------	------

[0262] Как показано в таблице 30, фармакодинамические эффекты REGN7999 и REGN8023 в отношении сывороточного гепсидина, сывороточного железа и насыщения трансферрина отслеживали в течение 57-дневного исследования. В группах, обработанных 5 мг/кг или 15 мг/кг REGN7999 или REGN8023, среднее содержание сывороточного железа снижалось на около 60% от исходных концентраций сывороточного железа в день 1 после введения.

[0263] Как показано в Таблице 31, насыщение трансферрина снижалось до около 12% в день 1 с около 35% на исходном уровне, что представляет собой улучшение способности сыворотки крови переносить железо. PD эффект в день 1 не зависел от дозы, что позволяет предположить насыщение связывания TMPRSS6 при концентрациях, достигаемых в день 1 как при низких, так и при высоких дозах REGN7999 и REGN8023. Снижение уровня сывороточного железа и насыщения трансферрина сохранялось в течение по меньшей мере 6 недель после введения дозы REGN7999 как в группах дозы 5 мг/кг, так и в группах дозы 15 мг/кг. В группе дозы 5 мг/кг REGN8023 фармакодинамический эффект в отношении сывороточного железа начал возвращаться к исходному уровню через примерно 1 неделю после IV введения и статистически не отличался от обработки изотипическим контролем на неделе 4. В группе дозы 15 мг/кг REGN8023, фармакодинамические эффекты имели более длительную продолжительность, чем в группе дозы 5 мг/кг REGN8023 вследствие устойчиво высоких концентраций лекарственного средства. Как сывороточное железо, так и насыщение трансферрина возвращались к примерно исходным значениям у большинства животных в день 57.

[0264] Как показано в таблице 32, сывороточные концентрации гепсидина немного повышались после введения дозы REGN7999 или REGN8023, хотя наблюдали более высокую вариабельность между животными.

Таблица 30. Фармакодинамика, средние (+/- SD) значения сывороточного железа

Группа дозы:	% изменения сывороточного железа по сравнению с исходным уровнем		
	День 1	День 29	День 57
Антитело изотипического контроля (15 мг/кг)	-17,1 ± 18,0	-22,9 ± 6,8	-13,0 ± 9,6
REGN7999 (5 мг/кг)	-62,7 ± 4,8 ****	-62,5 ± 2,9 ***	-31,6 ± 11,3
REGN7999 (15 мг/кг)	-65,0 ± 9,6 ****	-67,2 ± 4,9 ****	-30,9 ± 20,6
REGN8023 (5 мг/кг)	-59,9 ± 7,3 ***	-41,4 ± 14,7	-16,4 ± 15,7
REGN8023 (15 мг/кг)	-62,7 ± 8,4 ****	-69,9 ± 11,5 ****	-39,0 ± 19,3 *

Таблица 31. Фармакодинамика, средние (+/- SD) значения насыщения

трансферрина

Группа дозы:	Насыщение трансферрина (%)			
	Исходный уровень (день 0)	День 1	День 29	День 57
Антитело изотипического контроля (15 мг/кг)	34,6 ± 8,7	27,3 ± 9,2	24,5 ± 3,6	20,1 ± 0,4
REGN7999 (5 мг/кг)	34,9 ± 9,8	12,5 ± 4,8 ***	11,3 ± 2,4 **	18,8 ± 0,4
REGN7999 (15 мг/кг)	34,1 ± 1,8	12,3 ± 4,8 ***	10,4 ± 2,8 ***	17,3 ± 0,5
REGN8023 (5 мг/кг)	32,0 ± 3,4	12,9 ± 4,2 **	16,9 ± 3,8	15,8 ± 0,4
REGN8023 (15 мг/кг)	29,3 ± 7,7	11,7 ± 3,2 ***	9,1 ± 4,4 ***	14,3 ± 0,5

Таблица 32. Фармакодинамика, средние (+/- SD) значения сывороточного гепсидина

Группа дозы:	% изменения сывороточного гепсидина по сравнению с исходным уровнем		
	День 1	День 29	День 57
Антитело изотипического контроля (15 мг/кг)	-19,5	-36,4	-37,2
REGN7999 (5 мг/кг)	261,1	-32,1	-10,7
REGN7999 (15 мг/кг)	162,7**	50,4	4
REGN8023 (5 мг/кг)	52,2	-42,5	-18,8
REGN8023 (15 мг/кг)	132,2	7,9	-34,0

Все значения представляют собой среднее ± SD, n=3-4 на группу. Статистика - двусторонний ANOVA с критерием Даннетта; *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем; **p<0,01 по сравнению с изотипическим контролем; ***p<0,001 по сравнению с изотипическим контролем; ****p<0,0001 по сравнению с изотипическим контролем

Пример 15. Влияние REGN7999 на анаэробную способность в мышинной модели бета-талассемии

[0265] Оценивали влияние обработки REGN7999 на анаэробную способность в мышинной модели бета-талассемии.

[0266] Мышей получали с гетерозиготной делецией генов $\beta 1$ и $\beta 2$, которые повторяют промежуточную бета-талассемию у людей (Ginzburg, *Blood* (2011) 118(16):4321-4330), и гомозиготной экспрессией гемоювелина человека (HJV) в месте HJV мыши (обозначаемых Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}) на фоне C57BL/6/129S6. Мыши Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (пример 12 для получения более подробной информации о получении этих мышей).

[0267] Обработка REGN7999 у мышей Hbb^{th3/+}, по-видимому, приводит к

повышению количества эритроцитов, которые кажутся меньшими, более здоровыми и имеют более медленное обновление (см., например, пример 13). Однако было неизвестно, приведет ли это к функциональному улучшению эритроцитов после обработки REGN7999. Например, было неизвестно, способны ли эти меньшие, но более здоровые эритроциты доставлять достаточное количество кислорода в анаэробных условиях, например, во время бега на изнурение.

[0268] Для проверки этого мышей $Hbb^{th3/+}$ подвергали исследованиям в отношении принудительного бега (см. план исследования, изображенный на фигуре 1). Перед всеми экспериментами мышей тренировали в течение 2 недель на ленте шестиполосной моторизованной беговой дорожки (беговая дорожка Series 8, ИТС Life Science), снабженной шокерными пластинами. Для бега на изнурение базовую скорость (10 м/мин) увеличивали каждые 5 минут на 5 м/мин. Максимальный объем дистанции определялся в 60 мин. Мышей, которые либо оставались неактивными на электрошокере, либо получили 500 ударов током, удаляли с беговой дорожки.

[0269] Было обнаружено, что мыши $Hbb^{th3/+}$ пробегают значительно меньшее расстояние, чем мыши C57BL/6 дикого типа, обработанные антителом изотипического контроля (REGN1945), что позволяет предположить, что эти мыши быстрее утомлялись (фигура 2A). Мыши $Hbb^{th3/+}$, обработанные 10 мг/кг REGN7999, были способны пробежать такое же расстояние, что и животные дикого типа (фигура 2A), что указывает на то, что улучшение состояния эритроцитов, наблюдаемое при обработке REGN7999, отражается в улучшении анаэробной способности. Мыши C57BL/6 дикого типа, которым инъецировали REGN7999, не демонстрировали различий в пробеге по сравнению с мышами, обработанными изотипом, что указывает на то, что REGN7999 не улучшает беговые способности у отличных от $Hbb^{th3/+}$ мышей (фигура 3).

[0270] Также собирали данные об измерениях уровня лактата. Для определения образования лактата из хвостовой вены после бега на истощение брали 15 мл крови. Уровни лактата определяли с помощью лактометра (Nova Biomedical), как описано в Summermatter et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(21):8738-43. Контрольные мыши $Hbb^{th3/+}$ образовывали больше лактата в крови, несмотря на то, что они пробежали меньшую дистанцию, чем мыши $Hbb^{th3/+}$, обработанные REGN7999, что также указывает на улучшение состояния эритроцитов (фигура 2B).

Пример 16. Влияние REGN7999 и Acv2b(L79D)-Fc на содержание железа в печени и эффективность эритропоэза

[0271] Было показано, что Acv2b(L79D)-Fc улучшает неэффективный эритропоэз и повышает гемоглобин у мышей и людей (см., например, Cappellini et al. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1219-31; Suragani et al. *Blood*. 2014;123(25):3864-72). Как показано в данном документе, блокада TMPRSS6 с помощью REGN7999, по-видимому, улучшает неэффективный эритропоэз и приводит к образованию большего количества и более здоровых эритроцитов. Влияние обработки REGN7999 на содержание железа в печени и эффективность эритропоэза оценивали и сравнивали с обработкой Acv2b(L79D)-Fc в

мышинной модели бета-талассемии.

[0272] Для сравнения эффектов обработки REGN7999 (10 мг/кг) и обработки Acvr2b(L79D)-Fc (10 мг/кг), мышам Hbb^{th3/+} вводили одну из двух молекул в течение 8 недель. Содержание сывороточного гепсидина, сывороточного железа и железа в печени измеряли, как описано в примере 10. Через 8 недель обработки любой молекулой наблюдали, что обработка REGN7999 приводила к повышенному содержанию сывороточного гепсидина, снижению содержанию сывороточного железа и содержанию железа в печени, но обработка Acvr2b(L79D)-Fc не оказывала влияния на эти параметры (фигуры 4A-C). Acvr2b(L79D)-Fc повышал массу тела, но не влиял на массу печени (фигура 5). Было показано, что обработка REGN7999 снижает массу селезенки, но обработка Acvr2b(L79D)-Fc не приводила к этому (фигура 6). Контрольные мыши Hbb^{th3/+} имели значительную спленомегалию, которая частично устранялась обработкой REGN7999. Обработка Acvr2b(L79D)-Fc не приводила к каким-либо изменениям в спленомегалии мышей Hbb^{th3/+}.

[0273] У обработанных животных также собирали кровь для клинического анализа крови. Как видно из предыдущих примеров, клинический анализ крови показывает, что обработка REGN7999 значительно повышает количество эритроцитов у мышей Hbb^{th3/+} (таблица 33). Обработка Acvr2b(L79D)-Fc значительно повышала гемоглобин, но не количество эритроцитов по сравнению с контролями Hbb^{th3/+}. Однако обработка REGN7999 демонтировала значимое повышение количества RBC (таблица 33).

[0274] Для подтверждения этого результата использовали проточную цитометрию. Выделенные эритроциты из селезенки или костного мозга инкубировали с Fc-блокатором мыши (антитело к CD16/32, BD Biosciences) в течение 10 минут с последующей инкубацией с конъюгированным с изотиоцианата флуоресцеином (FITC) антителом к Ter119, конъюгированным с фикоэритрином (PE) антителом к CD71, конъюгированным с аллофиоцианином (APC) антителом к CD44 и коктейлем конъюгированных с APC-цианином 7 (APC-Cy7) антител к CD45/CD11b/Ly6G в течение 30 минут (все антитела BD Biosciences). Для исключения из анализа мертвых клеток, клетки окрашивали Sytox AADvanced в течение 30 минут (ThermoFisher). Все процедуры окрашивания проводили на льду. Компенсационные контроли выполняли с использованием гранул OneComp (Invitrogen) и готовили во время окрашивания клеток. Для правильного гейтирования целевых популяций готовили контрольную панель без одной. Все образцы измеряли на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman-Coulter).

[0275] Данные проточной цитометрии демонстрировали повышение количества зрелых эритроцитов в селезенке только у обработанных REGN7999 мышей, но не у обработанных Acvr2b(L79D)-Fc мышей (**фигура 7**). Обработка REGN7999 также продемонстрировала снижение количества ретикулоцитов, чего не наблюдали при обработке Acvr2b(L79D)-Fc (**фигура 8**).

Таблица 33. Клинический анализ крови мышей Hbb^{th3/+}, обработанных REGN7999 или Acvr2b(L79D)-Fc

Группа	REGN1945	Hbb ^{th3/+}	Hbb ^{th3/+}	Hbb ^{th3/+}
	WT	REGN1945	REGN7999	Acvr2b(L79D)-Fc
<i>n</i>	7	7	6	6
Эритроциты (М/мл)	10,25 ± 0,52	9,82 ± 1,47	11,65 ± 0,44**	11,08 ± 1,19
Ретикулоциты (% RBC)	0,001 ± 0,004	0,26 ± 0,41	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,21
Гематокрит (%)	42,64 ± 3,65	30,90 ± 3,95*	30,58 ± 1,76	31,82 ± 4,29
Гемоглобин (г/дл)	14,26 ± 0,63	10,11 ± 1,23*	10,37 ± 0,39	11,82 ± 1,24**
Средний корпускулярный объем (фл)	41,7 ± 1,27	31,63 ± 2,55*	26,25 ± 0,83**	31,35 ± 2,09***

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Таблица 34. Иллюстративные последовательности ДНК и белковые последовательности (последовательности белка) по настоящему изобретению

SEQ ID NO:	Последовательность ДНК/белка	Последовательность
1	ДНК	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTCAATAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGG AAGTAATGAATATTATTCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAA ATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATATTA TACTGTGCGAGAGATCAGGACTACGGTGGTAACCTCTTTCATTA CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA
2	Белок	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMHWVRQAP GKGLEWVAIISYDGSNEYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDQDYGGNLFHYWGQGLVTVSS
3	ДНК	GGATTCACCTTCAATAACTATGGC
4	Белок	GFTFNNG
5	ДНК	ATATCATATGATGGAAGTAATGAA

6	Белок	ISYDGSNE
7	ДНК	GCGAGAGATCAGGACTACGGTGGTAACCTCTTTCATTAC
8	Белок	ARDQDYGGNLFHY
9	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGA GCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA AAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGAT TTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCG ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA
10	Белок	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSTPPITFGQGTRLEIK
11	ДНК	CAGAGCATTAGCAGCTAT
12	Белок	QSISSY
13	ДНК	GCTGCATCC
14	Белок	AAS
15	ДНК	CAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACC
16	Белок	QSYSTPPIT
17	ДНК	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTCAATAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGG AAGTAATGAATATTATTCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAA ATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATATTA TACTGTGCGAGAGATCAGGACTACGGTGGTAACCTCTTTCATTACT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG CACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC

		<p>CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCT GAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAA ACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA GGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA</p>
18	Белок	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMHWVRQAP GKGLEWVAIISYDGSNEYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDQDYGGNLFHYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*</p>
19	ДНК	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGA GCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA AAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA</p>

		CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGAT TTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCG ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAAC TGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
20	Белок	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
21	ДНК	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTCAGTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGG AAGTAATGACTACTATTTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAACCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAAAGATCAGGGCTACGGTGGTAACCTCTTTGCCTCCT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
22	Белок	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPG KGLEWVAIISYDGSNDYYLDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NLRAEDTAVYYCAKDQGYGGNLFASWGQGTLVTVSS
23	ДНК	GGATTCACCTTCAGTACCTATGGC
24	Белок	GFTFSTYG
25	ДНК	ATATCATATGATGGAAGTAATGAC
26	Белок	ISYDGSND
27	ДНК	GCGAAAGATCAGGGCTACGGTGGTAACCTCTTTGCCTCC
28	Белок	AKDQGYGGNLFAS

29	ДНК	<p> CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTCAGTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGG AAGTAATGACTACTATTTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAACCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAAAGATCAGGGCTACGGTGGTAACCTCTTTGCCTCCT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG CACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCT GAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAA ACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA GGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA </p>
30	Белок	<p> QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPG KGLEWVAIISYDGSNDYYLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN </p>

		NLRAEDTAVYYCAKDQGYGGNLFASWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSGSSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*
31	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGC CGGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTC ACTTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAGCAAA ACTGATAGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAG GCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGT GTATTACTGTACCACAGTGGATAACGATTTTTGGAGTGGTT ATTATAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACTGTCTCCTCA
32	Белок	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDSGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTVDNDFWWSGYYNWFDPWGQGLVTV SS
33	ДНК	GGATTCACTTTCAGTAACGCCTGG
34	Белок	GFTFSNAW
35	ДНК	ATTAAGCAAACTGATAGTGGGACAACA
36	Белок	IKSKTDSGTT
37	ДНК	ACCACAGTGGATAACGATTTTTGGAGTGGTTATTATAACTG GTTCGACCCC
38	Белок	TTVDNDFWWSGYYNWFDP
39	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGC CGGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTC ACTTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAGCAAA

		<p>ACTGATAGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAG GCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGT GTATTACTGTACCACAGTGGATAACGATTTTTGGAGTGGTT ATTATAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCC CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAA GACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC CCACCCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGT CTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC AGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGT CTCTGGGTAAATGA</p>
40	Белок	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRISKTDSTGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTVDNDFWSGYYNWFDPWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD</p>

		HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK*
41	ДНК	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTAAGCC TGGGGGGTCCCTGAGAATTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTAT TTTTGTTGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTG GTAGTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAAT GAGTGGTCTGAGACCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTG TAAAAGTGGGTTCTATTACGTTAGGTCTTACTTTGACAAC GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
42	Белок	EVQLVESGGGLVKPGGSLRISCAASGFIFVDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMSG LRPEDTALYYCVKSGFYVRSYFDNWGQGTLVTVSS
43	ДНК	GGATTTATTTTTGTTGATTATGCC
44	Белок	GFIFVDYA
45	ДНК	ATTAGTTGGAATAGTGGTAGTATA
46	Белок	ISWNSGSI
47	ДНК	GTAAAAGTGGGTTCTATTACGTTAGGTCTTACTTTGACAAC
48	Белок	VKSGFYVRSYFDN
49	ДНК	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAG CCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGT ACCTGCGGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTAT ACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAG TGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGTA GGGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAA CGTATAGAGTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGT GGAGATCAA
50	Белок	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLR

		KPGQSPQLLIYTLSYRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEADD VGVYYCMQRIEFPLTFGGGKVEIK
51	ДНК	CAGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTAT
52	Белок	QSLSDSDGNTY
53	ДНК	ACGCTTCC
54	Белок	TLS
55	ДНК	ATGCAACGTATAGAGTTCCGCTCACT
56	Белок	MQRIEFPLT
57	ДНК	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTAAGCC TGGGGGGTCCCTGAGAATTTCTGTGCAGCCTCTGGATTTAT TTTTGTTGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTG GTAGTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAAT GAGTGGTCTGAGACCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTG TAAAAAGTGGGTTCTATTACGTTAGGTCTTACTTTGACAAC GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG CACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCT GAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCAAA ACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC

		<p>CAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA GGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA</p>
58	Белок	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRISCAASGFIFVDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMSG LRP EDTALYYCVKSGFYVRSYFDNWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLKG*</p>
59	ДНК	<p>GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAG CCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGT ACCTGCGGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTAT ACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAG TGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGTA GGGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAA CGTATAGAGTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGT GGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGTTAG</p>

60	Белок	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLR KPGQSPQLLIYTLASYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADD VGVYYCMQRIEFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC*
61	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC AGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTATAGCTTCTGGATTCA ACTTTGGTGATTATGGTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGTTTCATTAGAAGCAAAG CTTATGGTGGGACAACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTA TCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACGCAGCCATGT ATTACTGTTCTAGAGATTATTACGATATTTTGACTGGTTATT ATGGCGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
62	Белок	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCIASGFNFGDYGMSWVRQAPG KGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQM NSLKTEDAAMYCSRDIYDILTGYYGDIWGQGTLVTVSS
63	ДНК	GGATTCAACTTTGGTGATTATGGT
64	Белок	GFNFGDYG
65	ДНК	ATTAGAAGCAAAGCTTATGGTGGGACAACA
66	Белок	IRSKAYGGTT
67	ДНК	TCTAGAGATTATTACGATATTTTGACTGGTTATTATGGCGAC TAC
68	Белок	SRDYDILTGYGDY
69	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAG TATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCAGGCGTCTAGTTTAGAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGAC AGAATTCATCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTATTACTGCCAACAATAAATAGTTATTCTCGGA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

70	Белок	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYQASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSYSRTFGQGTKVEIK
71	ДНК	CAGAGTATTAGTAGCTGG
72	Белок	QSISSW
73	ДНК	CAGGCGTCT
74	Белок	QAS
75	ДНК	CAACAATATAATAGTTATTCTCGGACG
76	Белок	QQYNSYSRT
77	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC AGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTATAGCTTCTGGATTCA ACTTTGGTGATTATGGTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGTTTCATTAGAAGCAAAG CTTATGGTGGGACAACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTA TCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACGCAGCCATGT ATTACTGTTCTAGAGATTATTACGATATTTTGACTGGTTATT ATGGCGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCC CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCG TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACA CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCTT GCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTG TCCCCC AAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCC

		AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG GAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGG GTAAATGA
78	Белок	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCIASGFNFGDYGMSWVRQAPG KGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQM NSLKTEDAAMYCSRDIYDILTGYGDIYWGQGLTLTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPK SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK*
79	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAG TATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCAGGCGTCTAGTTTAGAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGAC AGAATCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTATTACTGCCAACAATATAATAGTTATTCTCGGA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA

		CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
80	Белок	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYQASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSYSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
81	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGC CTGGGGGGTCCCTGAGAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGTC ACTTTCAGTAACGTCTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGTTCC AGGGAAGGGGCTGGAATGGGTTGGCCGTATTAAGCAAA ACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAG GCAGATTTACCATCTCAAAAGATGATTCAAAAATACGTTG TTCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGACACAGCCGT GTATTACTGTACCACAGAGACCGGCGATTTTTGGAGTGGTT ATTATCCTCGCTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
82	Белок	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGVTFSNVWMSWVRQVP GKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISKDDSKNTLFL QMNSLKTEDTAVYYCTTETGDFWSGYYPHFQHWGQGLVTV SS
83	ДНК	GGAGTCACTTTCAGTAACGTCTGG
84	Белок	GVTFSNVW
85	ДНК	ATTAAGCAAAACTGATGGTGGGACAACA
86	Белок	IKSKTDGGTT
87	ДНК	ACCACAGAGACCGGCGATTTTTGGAGTGGTTATTATCCTCG CTTCCAGCAC
88	Белок	TTETGDFWSGYYPHFQH
89	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTA TATTAGCACCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCTAGCCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAA GTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTT GCATCTTACTCCTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGTAC

		ACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
90	Белок	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISTYLNWYQQKPGKA PSLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYSCQ QSYSTPPYTFGQGTKLEIK
91	ДНК	CAGTATATTAGCACCTAT
92	Белок	QYISTY
93	ДНК	CAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGTACACT
94	Белок	QQSYSTPPYT
95	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGC CTGGGGGGTCCCTGAGAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGTC ACTTTCAGTAACGTCTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGTTCC AGGGAAGGGGCTGGAATGGGTTGGCCGTATTAAGCAAA ACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAG GCAGATTTACCATCTCAAAAGATGATTCAAAAAATACGTTG TTCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGACACAGCCGT GTATTACTGTACCACAGAGACCGGCGATTTTTGGAGTGGTT ATTATCCTCGCTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAA GACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC CCACCCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGT CTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC AGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCA

		GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGT CTCTGGGTAAATGA
96	Белок	EVQLVESGGGLVKGPSLRVSCAASGVTFSSNVWMSWVRQVP GKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISKDDSKNTLFL QMNSLKTEDTAVYYCTTETGDFWSGYYPRFQHWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK*
97	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTA TATTAGCACCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCTAGCCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA GTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTT GCATCTTACTCCTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGTAC ACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACCTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
98	Белок	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQYISTYLNWYQQKPGKA

		PSLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYSCQ QSYSTPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
99	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTTAGTAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGA TACTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTG TGCGAAACATCAAGATTACGATTTTTCTACTACTACTCCGC TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CA
100	Белок	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPG KGLEWVSAISGSDTSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNS LRAEDTAVYYCAKHQDYDFSYYYSAMDVWGQGTTVTVSS
101	ДНК	GGATTCACCTTTAGTAGCTATGCC
102	Белок	GFTFSSYA
103	ДНК	ATTAGTGGTAGTGATACTAGCACA
104	Белок	ISGSDTST
105	ДНК	GCGAAACATCAAGATTACGATTTTTCTACTACTACTCCGCT ATGGACGTC
106	Белок	AKHQDYDFSYYYSAMDV
107	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCATCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGA TTTCAACAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCGACTTACTATTGTCAGCAGACTGACAGTTTCCCATTCA CTTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
108	Белок	DIQMTQSPSSLSASVGRVIITCRASQDFNSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

		QQTDSFPFTFGPGTKVDIK
109	ДНК	CAGGATTTCAACAGCTGG
110	Белок	QDFNSW
111	ДНК	CAGCAGACTGACAGTTTCCCATTCACT
112	Белок	QQTDSFPFT
113	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CCTTTAGTAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGA TACTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTG TGCGAAACATCAAGATTACGATTTTTTCTACTACTACTCCGC TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCG GCTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTG CCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGT CCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC

		CTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACTACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGG TAAATGA
114	Белок	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPG KGLEWVSAISGSDTSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNS LRAEDTAVYYCAKHQDYDFSYYYSAMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK*
115	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCATCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGA TTTCAACAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCGACTTACTATTGTCAGCAGACTGACAGTTTCCCATTCA CTTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
116	Белок	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIITCRASQDFNSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQTDSFPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

		LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
117	Белок	<p> GYKAEVMVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLTRRESSAFRSETAKA QKMLKELITSTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILQIPEHRR LMLSPEVVQALLVEELLSTVNSSAAVPYRAEYEVDPGLVILE ASVKDIAALNSTLGCYRYSYVGQGQVLRKGPDLASSCLWH LQGPKDLMLKLRLEWTLAECRDLAMYDVAGPLEKRLITSVY GCSRQEPVVEVLASGAIMAVVWKKGLHSYYDPFVLSVQPVVF QACEVNLTLDNRLDSQGVLPSTPYFPSYSPQTHCSWHLTVPSL DYGLALWFDAYALRRQKYDLPTQGGWTIQNRRLCGLRILQP YAERIPVVATAGITINFTSQISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGE FLCSVNGLCVPACDGVKDCPNGLDERNCVCRATFQCKEDSTCI SLPKVCDGQPDCLNDSDEEQCEGVPCGTFTFQCEDRSCVKKP NPQCDGRPDCRDGSDEEHDCGLQGPSSRIVGGAVSSEGEWP WQASLQVRGRHICGGALIADRWWITA AHCFQEDSMASVLTWT VFLGKVVQNSRWPGEVSFKVSRLLLHPYHEEDSHDYDVALLQ LDHPVVRSAAVRPVCLPARSHFFEPGLHCWITGWGALREGGPI SNALQKVDVQLIPQDLCSEVYRYQVTPRMLCAGYRKGKKDA CQGDAGGPLVCKALSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNYFGVYTR ITGVISWIQQVVTEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH </p>
118	Белок	<p> KAEVTVSQQVYSGSLRVLNRHFSQDLGRRESIAFRSESAKAQKM LQELVASTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILDIPEYQRLT LSPEVVRELLVDELLSNSSTLASYSKTEYEVDPGLVILEASVND IVVLNSTLGCYRYSYVNPQVLPKGPDPQTTSCSLWHLQGP DLMIKVRLEWTRVDCRDRVAMYDAAGPLEKRLITSVYGCSRQ EPVMEVLASGSVMAVVWKKGMHSYYDPFLLSVKSVAFQDCQ VNLTLLEGRLDTQGFLRTPYYPSPSTHCSWHLTVPSLDYGL ALWFDAYALRRQKYNRLCTQGQWMIQNRRLCGFRTLQPYAE RIPMVASDGVNTINFTSQISLTGPGVQVYYSLYNQSDPCPGEFLC SVNGLCVPACDGIKDCPNGLDERNCVCRAMFQCQEDSTCISLP RVCDRQPDCLNDSDEEQCEGVPCGTFTFQCEDRSCVKKPNPE CDGQSDCRDGSDEQHCDCGLQGLSSRIVGGTVSSEGEWPWQA SLQIRGRHICGGALIADRWWITA AHCFQEDSMASPKLWTVFLG KMRQNSRWPGEVSFKVSRLFLHPYHEEDSHDYDVALLQLDHP VVYSATVVRPVCLPARSHFFEPGQHCWITGWGAQREGGVSNT LQKVDVQLVPQDLCSEAYRYQVSPRMLCAGYRKGKKDACQG </p>

		DAGGPLVCREPSGRWFLAGLVSWSGLGCGRPNFFGVYTRVTRV INWIQQVLTEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH
119	Белок	GYKAEVTVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLTRRESSAFRSETAKAQ KMLKELIASTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILQIPEHRRL MLSPEVVQALLVEELLSTVNSSAAVPYRAEYEVDPEGLVILEA SVKDIAALNSTLGCYRYSYVGQGQVLRRLKGPDLASSCLWHL QGPEDLMLKLRLLEWTLAECRDLAMYDVAGPLEKRLITSVYG CSRQEPVVEVLASGAIMAVVWKKGLHSYYDPFMLSQSVVFQ ACEVNLTDDRDLDSQGVLPSTPYFSPYSPRTHCSWHLTVPSLD YGLALWFDAYALRRQKYDLPCTQGQWTIQNRRLCGLRILQPY AERIPVVATAGITINFTSQISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGEFL CSVNGLCVPACDGVKDCPNGLDERNCVCRAFQCQEDSTCISL LKVCDGQPDCLNGSDEERCQEGVPCGTFTFQCEDQSCVKKPN PQCDGRPDCRDGSDEQHCDCGLQGPSSRIVGGAVSSEGEWPW QASLQVRGRHICGGALIADRWWITA AHCFQEDSMASPALWTV FLGKVVQNSRWPGEVSFKVSRLLLHPYHEEDSHDYDVALLQL DHPVVRSAAVRPVCLPARSHFFEPGLHCWITGWGALREGGPTS NALQKVDVQLIPQDLCSEAYRYQVTPRMLCAGYRKGKKDAC QGDAGGPLVCKALSGRWFLAGLVSWSGLGCGRPNYFGVYTRIT GVIGWIQQVVTEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH
120	Белок	SHFFEPGLHCW
121	Белок	LVSWSGLGCGRPNYFGVYTRITGVISW
122	Белок	LITSTRLG
123	Белок	GEWPWQASL
124	Белок	STVLWTVFLGKVVQNSRWPGEVSFK
125	Белок	ITGWGALREGGPISNALQKVD
126	Белок	MLLLFHSKRMPVAEAPQVAGGQGDGGDGEEAEPEGMFKACE DSKRKARGYLRLVPLFVLLALLVLASAGVLLWYFLGYKAEV MVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLTRRESSAFRSETAKAQKMLKE LITSTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILQIPEHRRLMLSPE VVQALLVEELLSTVNSSAAVPYRAEYEVDPEGLVILEASVKDI AALNSTLGCYRYSYVGQGQVLRRLKGPDLASSCLWHLQGPK DLMLKLRLLEWTLAECRDLAMYDVAGPLEKRLITSVYGCSSRQ EPVVEVLASGAIMAVVWKKGLHSYYDPFVLSVQPVVVFQACEV

		<p>NLTLDNRLDSQGVLPSTPYFPSYYSPQTHCSWHLTVPSLDYGLA LWFDAYALRRQKYDLPCTQGQWTIQNRRLCGLRILQPYAERIP VVATAGITINFTSQISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGEFLCSVN GLCVPA CDG VKDCPNGLDERNCVCRATFQCKEDSTCISLPKVC DGQPDCLNGSDEEQCQEGVPCGTFTFQCEDRSCVKKPNPQCD GRPDCRDGSDEEHDCDCGLQGPSSRIVGGAVSSEGEWPWQASL QVRGRHICGGALIADRWVITAAHCFQEDSMAS TVLWTVFLGK VWQNSRWPGEVSVFKVSRLLLHPYHEEDSHDYDVALLQLDHPV VRSAAVRPVCLPARSHFFEPGLHCWITGWGALREGGPISNALQ KVDVQLIPQDLCSEVYRYQVTPRMLCAGYRKGKKDACQGDS GGPLVCKALSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNYFGVYTRITGVIS WIQQVVT</p>
127	ДНК	<p>CTTGAGCCAGACCCAGTCCAGCTCTGGTGCCTGCCCTCTGGT GCGAGCTGACCTGAGATGCACTTCCCTCCTCTGTGAGCTGTC TCGGCACCCACTTGCAGTCACTGCCGCCTGATGTTGTTACTC TTCCACTCCAAAAGGATGCCCGTGGCCGAGGCCCCCCCAGGT GGCTGGCGGGCAGGGGGACGGAGGTGATGGCGAGGAAGCG GAGCCGGAGGGGATGTTCAAGGCCTGTGAGGACTCCAAGA GAAAAGCCCGGGGCTACCTCCGCCTGGTGCCCCTGTTTGTG CTGCTGGCCCTGCTCGTGCTGGCTTCGGCGGGGGTGCTACTC TGGTATTTCTAGGGTACAAGGCGGAGGTGATGGTCAGCCA GGTGTACTCAGGCAGTCTGCGTGTACTCAATCGCCACTTCTC CCAGGATCTTACCCGCCGGGAATCTAGTGCCTTCCGCAGTG AAACCGCCAAAGCCCAGAAGATGCTCAAGGAGCTCATCAC CAGCACCCGCCTGGGA ACTTACTACA ACTCCAGCTCCGTCT ATTCCTTTGGGGAGGGACCCCTCACCTGCTTCTTCTGGTTCA TTCTCAAATCCCCGAGCACCGCCGGCTGATGCTGAGCCCC GAGGTGGTGCAGGCACTGCTGGTGGAGGAGCTGCTGTCCAC AGTCAACAGCTCGGCTGCCGTCCCCTACAGGGCCGAGTACG AAGTGGACCCCGAGGGCCTAGTGATCCTGGAAGCCAGTGTG AAAGACATAGCTGCATTGAATTCCACGCTGGGTTGTTACCG CTACAGCTACGTGGGCCAGGGCCAGGTCCCTCCGGCTGAAGG GGCCTGACCACCTGGCCTCCAGCTGCCTGTGGCACCTGCAG GGCCCCAAGGACCTCATGCTCAA ACTCCGGCTGGAGTGGAC GCTGGCAGAGTGCCGGGACCGACTGGCCATGTATGACGTGG</p>

CCGGGCCCCTGGAGAAGAGGCTCATCACCTCGGTGTACGGC
TGCAGCCGCCAGGAGCCCGTGGTGGAGGTTCTGGCGTCGGG
GGCCATCATGGCGGTCTGCTGGAAGAAGGGCCTGCACAGCT
ACTACGACCCCTTCGTGCTCTCCGTGCAGCCGGTGGTCTTCC
AGGCCTGTGAAGTGAACCTGACGCTGGACAACAGGCTCGAC
TCCCAGGGCGTCCTCAGCACCCCGTACTTCCCCAGCTACTAC
TCGCCCCAAACCCACTGCTCCTGGCACCTCACGGTGCCCTCT
CTGGACTACGGCTTGGCCCTCTGGTTTGATGCCTATGCACTG
AGGAGGCAGAAGTATGATTTGCCGTGCACCCAGGGCCAGTG
GACGATCCAGA
ACAGGAGGCTGTGTGGCTTGCGCATCCTGCAGCCCTACGCC
GAGAGGATCCCCGTGGTGGCCACGGCCGGGATCACCATCAA
CTTCACCTCCCAGATCTCCCTCACCGGGCCCGGTGTGCGGGT
GCACTATGGCTTGTACAACCAGTCGGACCCCTGCCCTGGAG
AGTTCCTCTGTTCTGTGAATGGACTCTGTGTCCCTGCCTGTG
ATGGGGTCAAGGACTGCCCAACGGCCTGGATGAGAGAAA
CTGCGTTTGCAGAGCCACATTCCAGTGCAAAGAGGACAGCA
CATGCATCTCACTGCCAAGGTCTGTGATGGGCAGCCTGAT
TGTCTCAACGGCAGCGACGAAGAGCAGTGCCAGGAAGGGG
TGCCATGTGGGACATTCACCTTCCAGTGTGAGGACCGGAGC
TGCGTGAAGAAGCCCAACCCGCAGTGTGATGGGCGGCCCCG
ACTGCAGGGACGGCTCGGATGAGGAGCACTGTGACTGTGGC
CTCCAGGGCCCCTCCAGCCGCATTGTTGGTGGAGCTGTGTC
CTCCGAGGGTGAGTGGCCATGGCAGGCCAGCCTCCAGGTTC
GGGGTCGACACATCTGTGGGGGGGCCCTCATCGCTGACCGC
TGGGTGATAACAGCTGCCCACTGCTTCCAGGAGGACAGCAT
GGCCTCCACGGTGTGTGGACCGTGTTCCTGGGCAAGGTGT
GGCAGAACTCGCGCTGGCCTGGAGAGGTGTCCTTCAAGGTG
AGCCGCCTGCTCCTGCACCCGTACCACGAAGAGGACAGCCA
TGACTACGACGTGGCGCTGCTGCAGCTCGACCACCCGGTGG
TGCGCTCGGCCGCCGTGCGCCCCGTCTGCCTGCCCGCGCGC
TCCCACTTCTTCGAGCCCGGCCTGCACTGCTGGATTACGGGC
TGGGGCGCCTTGC GCGAGGGGCGGCCCCATCAGCAAACGCTCT
GCAGAAAGTGGATGTGCAGTTGATCCCACAGGACCTGTGCA
GCGAGGTCTATCGCTACCAGGTGACGCCACGCATGCTGTGT

		<p>GCCGGCTACCGCAAGGGCAAGAAGGATGCCTGTCAGGGTG ACTCAGGTGGTCCGCTGGTGTGCAAGGCACTCAGTGGCCGC TGGTTCCTGGCGGGGCTGGTCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGG CCGGCCTAACTACTTCGGCGTCTACACCCGCATCACAGGTG TGATCAGCTGGATCCAGCAAGTGGTGACCTGAGGAACTGCC CCCCTGCAAAGCAGGGCCCACCTCCTGGACTCAGAGAGCCC AGGGCAACTGCCAAGCAGGGGGACAAGTATTCTGGCGGGG GGTGGGGGAGAGAGCAGGCCCTGTGGTGGCAGGAGGTGGC ATCTTGTCTCGTCCCTGATGTCTGCTCCAGTGATGGCAGGAG GATGGAGAAGTGCCAGCAGCTGGGGGTCAAGACGTCCCCT GAGGACCCAGGCCACACCCAGCCCTTCTGCCTCCCAATTC TCTCTCCTCCGTCCCCTTCTCCACTGCTGCCTAATGCAAGG CAGTGGCTCAGCAGCAAGAATGCTG GTTCTACATCCCGAGGAGTGTCTGAGGTGCGCCCCACTCTG TACAGAGGCTGTTTGGGCAGCCTTGCCTCCAGAGAGCAGAT TCCAGCTTCGGAAGCCCCTGGTCTAACTGGGATCTGGGAA TGGAAGGTGCTCCATCGGAGGGGACCCTCAGAGCCCTGGA GACTGCCAGGTGGGCCTGCTGCCACTGTAAGCCAAAAGGTG GGGAAGTCCTGACTCCAGGGTCCTTGCCCCACCCCTGCCTG CCACCTGGGCCCTCACAGCCCAGACCCTCACTGGGAGGTGA GCTCAGCTGCCCTTTGGAATAAAGCTGCCTGATCCAAAAAA AAAAAAAAAAAA</p>
128	Белок	<p>MPVAKAPQVAGGQGDGGDGEEAEPEGMFEACEDSKRKARGY LRLAPLWLTLVVLTSVGVLLWYFLGYKAEVTVSQVYSGSLRV LNRHFSQDLTRRESSAFRSETAKAQKMLKELIASTRLGTYNS SSVYSFGEGLTCCFFWFILQIPEHRRMLMSPEVVQALLVEELLST VNSSAAVPYRAEYEVDPEGLVILEASVKDIAALNSTLGCYRYS YVGQGQVLRKGPDLHLASSCLWHLQGPEDLMLKLRLEWTLA ECRDLAMYDVAGPLEKRLITSVYGCSRQEPVVEVLASGAIM AVVWKKGLHSYYDPFMLSQSVVFQACEVNLTDDRDLDSQG VLSTPYFPSYYSPRTHCSWHLTVPSLDYGLALWFDAYALRRQ KYDLPCTQGQWTIQNRRLCGLRILQPYAERIPVVATAGITINFT SQISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGEFLCSVNGLCVPACDGVK DCPNGLDERNCVCRATFQCQEDSTCISLLKVC DGQPDCR DGSDE EERCQEGVPCGTFTFQCEDQSCVKKPNPQCDGRPD CRDGSDE</p>

		<p>QHCDCGLQGPSSRIVGGAVSSEGEWPWQASLQVRGRHICGGA LIADRWVITAAHCFQEDSMASPALWTVFLGKVVQNSRWPGE VSFKVSRLLLHPYHEEDSHDYDVALLQLDHPVVRSAAVRPVC LPARSHFFEPGLHCWITGWGALREGGPTSNALQKVDVQLIPQD LCSEAYRYQVTPRMLCAGYRKGKKDACQGDSGGPLVCKALS GRWFLAGLVSWGLGCGRPNYFGVYTRITGVIGWIQQVVT</p>
129	ДНК	<p>CTCAGTCACAGTGCCGTCCTGGGCCACAGCAGGAGGAGCCCC ATGGAGCCTGGGGCCACAGGCCACAGGGGACAAGGGCCAG ACACCCTGGCCATGGCTCTAGGCCATTGATCCAGGCCGGGC TGGCACGGTGGGGGTAGGGAGGCCTTGGCCTGGACAAACA AAGGCTTCTGAGGCCTGCGTGCAGGCCACCTATCCGC CACTCCCAAAGGATGCCTGTGGCCAAGGCCCCCAAGGTGGC TGGTGGGCAGGGGGACGGAGGTGATGGCGAGGAAGCGGAG CCAGAGGGGATGTTTCGAGGCCTGTGAGGACTCCAAGAGAA AAGCCCGGGGCTACCTCCGCCTGGCGCCCCTGTGGCTGACC CTGGTTGTGCTGACTTCAGTGGGGGTGCTACTCTGGTATTTT CTAGGGTACAAGGCGGAGGTGACGGTCAGCCAGGTGTACTC AGGCAGCCTTCGCGTGCTCAATCGCCACTTCTCCAGGATCT TACCCGCCGGGAATCCAGTGCCTTCCGCAGTGAAACCGCCA AAGCCAGAAGATGCTCAAGGAGCTCATCGCCAGCACCCGC CTGGGAACTTATTACA ACTCCAGCTCCGTCTATTCCTTTGGG GAGGGACCGCTCACCTGCTTCTTCTGGTTCATTCTCCAAATC CCCGAGCACCGCCGGCTGATGCTGAGCCCCGAGGTGGTGCA GGCACTGCTGGTGGAGGAGCTGCTGTCCACAGTCAACAGCT CGGCGGCCGTCCCCTACAGGGCCGAGTACGAAGTGGACCCC GAGGGCCTAGTGATCCTAGAAGCCAGTGTGAAAGACATAG CTGCACTGAATTCCACGCTGGGTTGTTACCGCTACAGCTAC GTGGGCCAGGGTCAGGTCCTCCGGCTGAAGGGACCCGACCA CCTGGCCTCCAGCTGCCTGTGGCACCTGCAGGGCCCCGAAG ACCTCATGCTGAAACTCCGGCTGGAGTGGACGCTGGCCGAG TGCCGGGACCGACTGGCCATGTATGACGTGGCTGGGCCCT GGAGAAGAGGCTCATCACCTCGGTGTATGGCTGCAGCCGCC AGGAGCCTGTGGTGGAAAGTCCTGGCATCGGGGGCCATCATG GCGGTGGTCTGGAAGAAGGGCCTGCACAGCTACTACGACCC CTTTATGCTCTCCGTGCAGTCGGTGGTCTTCCAGGCCTGCGA</p>

GGTAAACCTGACGCTGGATGACAGGCTGGACTCCCAGGGCG
TCCTCAGCACCCCGTACTTCCCCAGCTACTACTCGCCCCGAA
CCCCTGCTCCTGGCACCTCACGGTGCCTTCTCTGGACTACG
GCTTGGCCCTCTGGTT
TGACGCCTACGCACTGCGGAGGCAGAAGTATGATTTGCCGT
GCACCCAGGGCCAGTGGACGATCCAGAACAGGAGGCTGTG
TGGCCTGCGCATCCTGCAGCCTTACGCTGAGAGGATCCCCG
TGGTGGCCACGGCCGGCATCACCATCAATTTACCTCCCAG
ATCTCCCTCACAGGGCCTGGTGTGCGGGTGCCTATGGCTT
GTACAACCAGTCGGACCCCTGCCCTGGAGAGTTCCTCTGCT
CTGTGAACGGACTCTGCGTCCCTGCCTGTGATGGGGTCAAG
GACTGCCCCAACGGCCTGGATGAGAGAACTGCGTTTGCAG
AGCCACATTCCAGTGCCAAGAGGACAGCACGTGCATCTCAC
TGCTTAAGGTCTGTGACGGGCAGCCTGACTGTCTCAACGGC
AGCGATGAAGAGCGGTGCCAGGAAGGGGTGCCCTGCGGGA
CATTACCTTCCAGTGTGAGGACCAGAGCTGCGTGAAGAAG
CCCAACCCACAGTGTGATGGGCGGCCCGACTGCAGGGACG
GCTCAGACGAGCAGCACTGTGACTGTGGCCTCCAGGGCCCC
TCCAGTCGCATTGTTGGTGGGGCCGTGTCCTCCGAGGGTGA
GTGGCCATGGCAGGCCAGCCTCCAGGTTCCGGGGTCGACACA
TCTGTGGGGGCGCCCTCATCGCTGACCGCTGGGTGATAACA
GCTGCCCATGCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCTCCCCGGC
GCTGTGGACGGTGTTCCTGGGCAAGGTGTGGCAGAACTCGC
GCTGGCCTGGAGAGGTGTCCTTCAAGGTGAGCCGCCTACTC
CTGCATCCGTATCACGAAGAGGACAGCCACGACTACGACGT
GGCGCTGTTGCAGCTCGACCACCCGGTGGTGCCTCGGCCG
CCGTGCGTCCAGTCTGCCTGCCCGCGCGCTCCCACTTCTTCG
AACCCGGCCTGCACTGCTGGATCACTGGCTGGGGCGCCCTG
CGCGAAGGCGGCCCCACCAGCAATGCTCTGCAGAAAGTGG
ACGTGCAGTTGATCCACAGGACCTGTGCAGCGAGGCCTAT
CGCTACCAGGTGACGCCACGCATGCTGTGTGCCGGCTACCG
CAAGGGCAAGAAGGATGCCTGCCAGGGTGACTCGGGTGGT
CCGCTGGTATGCAAGGCACTCAGTGGCCGCTGGTTCCTGGC
AGGGCTGGTCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGCCGACCTAACT
ACTTCGGCGTCTACACCCGCATCACAGGTGTGATCGGCTGG

		<p>ATCCAGCAAGTGGTGACCTGAGGAACTGCCCCCTGCAGAG CAGGTCCCACCTCTTGGACTCAGAGAGCCCAGGGCAATTGC CAAGCAGGGGGACAAGTATTCTGGGGGGAGGGGGGCGCGA GCAGGCCCTGTGGTGGCAGGAGGTGGCATCTTGTCTTGTCC CTGATGTCTGCTCCAGTGATGGCAGGAGGATGGAGGAGTGC CAGCAGCTGGGGGTCAAGACGTCCCCTGGGGACCCAGGCCC ACACCCAGCCCTTCTGCCTCCCGATTCTCTCTCCTCCGTCCC CTTCCTCCACTGCTGCCTATTGCAAGGAAGTGGCTCAGCAG CAAGAATGCTGGCTCTACGTCCCCAGGAGTGTCTGAGCTGT GCCCCGCTCTGTACAGAGGCTGCTTGGGCAGCCTTGCCTCT AGAGAGCAGATGCCAGCTTCGGAAGCCCCTGGTCTAACTTG GGATCTGGGAATGGAAGGTGCCCCCATAGGAGGGGACCCT CACAGCCCTGGGGACTGCCAGGTGGGCCGGCTGCCACCGTA AGCCAAAAAAGGTGGGAAGCCCTGACTCCAAGGTCCTTGC CCCACCCCTGCCTGCCACCTGGCCCCTCACAGCCAGACCC TCACCGGCAGGTGAGCTCAGCTGCCCTTTGGAATAAAGCTG CCTGATCCAA</p>
130	Белок	<p>MPRCFQLPCSTRMPTTEVPQAADGQGDAGDGEEAAEPEGKFK PPKNTKRKNRDYVRFTPLLLVLAALVSAGVMLWYFLGYKAE VTVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLGRRESIAFRSESAKAQKMLQE LVASTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILDIPEYQRLTSLPE VVRELLVDELLENSTLASYSKTEYEVDPEGLVILEASVNDIVVL NSTLGCYRYSYVNPQVPLKGPDQQTTSCLWHLQGPEDLMI KVRLEWTRVDCRDRVAMYDAAGPLEKRLITSVYGCSRQEPV MEVLASGSVMVWKKGMHSYYDPFLLSVKSVAFQDCQVN LTLEGRLDTQGFLRTPYYPSPSTHCSWHLTVPSLDYGLAL WFDAYALRRQKYNRLCTQGQWMIQNRRLCGFRTLQPYAERIP MVASDGVTFINFTSQISLTGPGVQVYYSLYNQSDPCPGEFLCSV NGLCVPACDGIKDCPNGLDERNCVCRAMFQCQEDSTCISLPRV CDRQPDCLNGSDEEQCQEGVPCGTFTFQCEDRSCVKKPNPECD GQSDCRDGSDEQHCDGLQGLSSRIVGGTVSSEGEWPWQASL QIRGRHICGGALIADRWWITA AHCFQEDSMASPKLWTVFLGK MRQNSRWPGEVSFKVSRLFLHPYHEEDSHDYDVALLQLDHPV VYSATVRPVCLPARSHFFEPGQHCWITGWGAQREGGPVSNTL QKVDVQLVPQDLCSEAYRYQVSPRMLCAGYRKGKKDACQGD</p>

		SGGPLVCREPSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNFFGVYTRVTRVI NWIQQVLT
131	ДНК	AGTTTCATTGTGCGCCCTGGACCTGACAGGAGAGGCCCATGG AACTTGGGGCCACAGGCCACAAGGGACAAGGGCCAGACAC CCCAGCCATGGCTCCAGGCCATTGATCCAACCTAAGCTGGC CAGTTGGGGGTGGAAAGACCTTGGCCTGGATAAACAGAGG CCTCCAGGCCTGTGTGCAGGCCCGGCACCTACCTTCCACTCT TGAAGATGCCGAGATGTTTCCAGCTCCCCTGTTCTACCAGG ATGCCACCACCGAGGTCCCCAAGCGGCTGATGGTCAGGG CGATGCGGGTGATGGAGAGGAAGCTGCTGAGCCAGAGGGG AAGTTCAAGCCCCAAAAACACCAAGAGAAAAAACCGGG ACTACGTCCGCTTCACGCCACTGTTGCTGGTCTTGGCTGCGC TGGTCTCAGCAGGGGTCATGCTTTGGTATTTCTAGGGTACA AAGCGGAAGTGACCGTAAGCCAGGTGTACTCTGGCAGCCTC CGGGTGCTCAACCGTCATTTCTCCCAGGACCTGGGCCGACG GGAGTCTATTGCTTTCCGCAGTGAATCTGCCAAAGCCCAGA AGATGCTCCAAGA ACTGGTTGCCAGCACCCGCCTGGGTACT TACTACA ACTCTAGTTCTGTCTACTCCTTTGGGGAGGGACCC CTCACCTGCTTCTTCTGGTTTATCCTTGACATCCCTGAGTAC CAGCGACTGACCCTGAGCCCTGAAGTAGTGCGCGAGCTCCT GGTGGATGAGCTACTGTCCAACAGCTCAACCCTGGCTTCCT ATAAGACCGAATATGAGGTGGACCCGGAAGGCCTGGTGAT CCTGGAAGCCAGTGTGAACGACATAGTCGTA CTGAATTCCA CGCTGGGCTGTTATCGCTACAGCTATGTGAACCCAGGCCAG GTCCCTCCATTGAAGGGGCCTGACCAGCAGACCACAAGCTG CCTGTGGCATCTGCAAGGGCCC GAAGACCTCATGATCAAAG TGCGGCTGGAGTGGACCCGGGTCGATTGCAGAGACAGGGT GGCGATGTACGACGCAGCTGGGCCCTGGAGAAGAGACTT ATCACCTCGGTCTATGGGTGCAGCCGCCAGGAACCTGTGAT GGAGGTGCTGGCATCGGGCTCCGTCATGGCCGTGGTGTGGA AAAAGGGCATGCATAGCTACTATGACCCTTTCTGCTCTCA GTGAAGTCTGTGGCCTTCCAGGACTGCCAGGTGAACCTGAC ACTGGAGGGCCGGCTGGACACACAGGGCTTCCTCCGTACAC CCTACTACCCAGTTACTACTCTCCCAGTACCCACTGCTCCT GGCATCTCACGGTACCCTCTCTGGACTACGGCTTGGCGCTCT

GGTTCGATGCCTACGCACTGAGGAGGCAGAAGTACAACCG
ACTGTGTACTCAGGGCCAGTGGATGATCCAGAACAGGAGGC
TGTGTGGCTTCCGTACCCTGCAGCCATATGCTGAGAGGATC
CCCATGGTGGCCTCAGATGGTGTCAACATCAACTTCACCTCC
CAGATCTCCCTCACAGGCCCGGGTGTGCAAGTGTACTACAG
CTTGTACAACCAATCAGACCCCTGCCCTGGTGAGTTCCTCTG
CTCTGTGAAT
GGACTGTGTGTCCCTGCGTGTGACGGGATCAAGGACTGCCC
CAATGGCCTGGATGAGAGAACTGTGTCTGCAGAGCCATGT
TCCAGTGCCAAGAGGACAGCACGTGCATTTCACTGCCTAGA
GTCTGTGACCGGCAGCCCGACTGTCTCAATGGCAGTGACGA
AGAACAGTGCCAAGAAGGAGTGCCCTGTGGGACATTCACTT
TCCAGTGTGAGGACCGGAGCTGTGTGAAGAAGCCCAACCCA
GAGTGTGACGGCCAGTCAGATTGCAGAGACGGCTCAGATG
AGCAACACTGTGACTGTGGCCTCCAGGGCCTCTCCAGCCGT
ATTGTGGGCGGGACCGTGTCTCCGAGGGTGAGTGGCCATG
GCAGGCCAGCCTCCAGATTCGGGGTGCACACATCTGTGGGG
GGGCTCTCATCGCTGACCGCTGGGTCATAACGGCCGCCAC
TGCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCTCCCCGAAGCTGTGGAC
CGTGTTCCCTGGGAAAGATGCGGCAGAACTCGCGCTGGCCAG
GCGAGGTGTCTTCAAGGTGAGCCGTCTGTTCCCTGCACCCG
TACCACGAGGAGGACAGCCATGACTACGACGTGGCCCTGCT
GCAGCTCGACCACCCCGTGGTGTACTCGGCCACTGTGCGCC
CCGTCTGCCTGCCTGCCCGCTCCCCTTCTTTGAGCCAGGCC
AGCACTGCTGGATCACAGGCTGGGGAGCCCAGCGAGAGGG
TGGTCCGGTGAGCAACACCCTGCAGAAGGTGGACGTACAGC
TGGTCCCTCAGGACCTCTGCAGTGAGGCCTACCGCTACCAG
GTGTCCCCACGCATGCTCTGTGCTGGCTACCGCAAGGGCAA
GAAAGATGCCTGCCAGGGTGACTCTGGAGGCCCACTGGTTT
GCAGGGAGCCCAGTGGCCGCTGGTTCCTGGCAGGGTTGGTT
AGCTGGGGCCTGGGCTGTGGCCGACCCAATTTCTTTGGCGT
CTACACCCGTGTACACGTGTGATCAACTGGATCCAGCAGG
TGCTGACCTGAGGGCTGTTCTACAGAGCTGGACCTGCCTCC
AGGCCAAGTTCAGGGTGTCCACCCAGCCAGGACACAAGTAT
TCTGGGGCAAGTGACCCTGCTAAGGCCTGTTTCCCTCAGGC

	<p>CTACCCAGTGACAGTACAGAGAAGGATGTCAGCTGGTGGT TAGGATGCCTCCTGAGGTCCAGGGGCCAGCCTCGGCTAGGT TCACTTCTAACCCTTTCTTATTCTAGTCCTTTCCCCTCCCTG CTCCTACCACTGTTTTGGAGTGGGGTCTGGCGGCCATGACCT TGGCCTCCGGGTCTCTGTAGGAAAGAAAGAATCCTTCCCCT TGCAAAGCCTCTTGGGGGAAGTGCACAGAGAAAGAAGGT GCCTCTATCAAGGCTCTATCAGAGCCCTTGAGTCTGCCAAG TGGGCTGTACTCTAAGCCAAATCACCGGGCAGCCTCAGCTG CAGATGCCTGCTGAAGCTCTGCCTGCTACAGGGGCCTCCCT GCCATTCAGTGGAGGCCCACTGTCTGTTCTGGGAATAAAGC ACTTGACCAAGCCCTGACACTGAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с каталитическим доменом TMPRSS6, но не связываются с каталитической триадой TMPRSS6.

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно связываются в сайте, содержащимся в домене 2 LDLRa TMPRSS6.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, причем связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с TMPRSS6 не окклюдирует непосредственно каталитическую триаду TMPRSS6.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, причем связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с TMPRSS6 опосредует аллостерическую регуляцию TMPRSS6.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, причем связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с TMPRSS6 опосредует аллостерическое ингибирование TMPRSS6.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой аллостерический ингибитор TMPRSS6.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент поддерживают TMPRSS6 в неактивной конформации, которая способна связываться с субстратом TMPRSS6, но не расщеплять его.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, причем субстратом TMPRSS6 является гемоювелин (HJV).

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются в каталитическом домене TMPRSS6 в сайте, который стерически окклюдирует каталитическую триаду TMPRSS6.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с гемоювелином (HJV) за связывание с TMPRSS6.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 человека (hTMPRSS6) (SEQ ID NO:126), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с одной или более аминокислотами, содержащимися во внеклеточном

домене hTMPRSS6, как определяется с помощью водородно-дейтериевого обмена.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) аминокислот 125-133 SEQ ID NO: 126; (b) аминокислот 586-594 SEQ ID NO: 126; (c) аминокислот 626-650 SEQ ID NO: 126; (d) аминокислот 693-703 SEQ ID NO: 126; (e) аминокислот 704-724 SEQ ID NO: 126; и/или (e) аминокислот 780-805 SEQ ID NO: 126, как определяется с помощью водородно-дейтериевого обмена.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) аминокислот 693-703 SEQ ID NO: 126; и/или (b) аминокислот 780-805 SEQ ID NO: 126, как определяется с помощью водородно-дейтериевого обмена.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) аминокислот 125-133 SEQ ID NO: 126; (b) аминокислот 586-594 SEQ ID NO: 126; (c) аминокислот 626-650 SEQ ID NO: 126; и/или (d) аминокислот 704-724 SEQ ID NO: 126, как определяется с помощью водородно-дейтериевого обмена.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с остатками G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 и N791 TMPRSS6 человека (SEQ ID NO:126), как определяется с помощью структурного моделирования на основе криоэлектронной микроскопии.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно взаимодействуют с остатками V490, S501, T502, C503, I504, S505 и K508 TMPRSS6 человека (SEQ ID NO:126), как определяется с помощью структурного моделирования на основе криоэлектронной микроскопии.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с остатками R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715 и I716 TMPRSS6 человека, как определяется с помощью структурного моделирования на основе криоэлектронной микроскопии.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком трансмембранной сериновой протеазой 6 (TMPRSS6), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и

HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR); и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), причем HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности HCDR3, указанной в таблице 1.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, в которых последовательность LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности LCDR3, указанной в таблице 1.

20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 18 или п. 19, которые содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, указанные в таблице 1.

21. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 18-20, которые содержат последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанные в таблице 1.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 18-21, в которых:

(a) домен HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 24, 34, 44, 64, 84 или 102;

(b) домен HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 66, 86 или 104;

(c) домен HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, 28, 38, 48, 68, 88 или 106;

(d) домен LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12, 52, 72, 92 или 110;

(e) домен LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14, 54 или 74; и

(f) домен LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 56, 76, 94 или 112.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 18-22, в которых три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи включают один из следующих наборов CDR:

(a) SEQ ID NO: 4 (HCDR1), SEQ ID NO:6 (HCDR2), SEQ ID NO:8 (HCDR3), SEQ ID NO:12 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:16 (LCDR3);

(b) SEQ ID NO: 24 (HCDR1), SEQ ID NO:26 (HCDR2), SEQ ID NO:28 (HCDR3), SEQ ID NO:12 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:16 (LCDR3);

(c) SEQ ID NO: 34 (HCDR1), SEQ ID NO:36 (HCDR2), SEQ ID NO:38 (HCDR3), SEQ ID NO:12 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:16 (LCDR3);

(d) SEQ ID NO: 44 (HCDR1), SEQ ID NO:46 (HCDR2), SEQ ID NO:48 (HCDR3), SEQ ID NO:52 (LCDR1), SEQ ID NO:54 (LCDR2) и SEQ ID NO:56 (LCDR3);

(e) SEQ ID NO: 64 (HCDR1), SEQ ID NO:66 (HCDR2), SEQ ID NO:68 (HCDR3), SEQ ID NO:72 (LCDR1), SEQ ID NO:74 (LCDR2) и SEQ ID NO:76 (LCDR3);

(f) SEQ ID NO: 84 (HCDR1), SEQ ID NO:86 (HCDR2), SEQ ID NO:88 (HCDR3), SEQ ID NO:92 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:94 (LCDR3); или

(g) SEQ ID NO: 102 (HCDR1), SEQ ID NO:104 (HCDR2), SEQ ID NO:106 (HCDR3), SEQ ID NO:110 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:112 (LCDR3).

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 18-23, в которых три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи включают следующий набор CDR:

SEQ ID NO: 44 (HCDR1), SEQ ID NO:46 (HCDR2), SEQ ID NO:48 (HCDR3), SEQ ID NO:52 (LCDR1), SEQ ID NO:54 (LCDR2) и SEQ ID NO:56 (LCDR3).

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 18-23, в которых три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи включают следующий набор CDR:

SEQ ID NO: 102 (HCDR1), SEQ ID NO:104 (HCDR2), SEQ ID NO:106 (HCDR3), SEQ ID NO:110 (LCDR1), SEQ ID NO:14 (LCDR2) и SEQ ID NO:112 (LCDR3).

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с TМPRSS6, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR; при этом HCVR содержит:

(i) аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100;

(ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100;

(iii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 и 100; или

(iv) аминокислотную последовательность, содержащую не более 12 аминокислотных замен по отношению к последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100.

27. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 26, в которых LCVR содержит:

(a) аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108;

(b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108;

(c) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108; или

(d) аминокислотную последовательность, содержащую не более 10 аминокислотных замен по отношению к последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 26 или п. 27, содержащие HCVR, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 или 100.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 26-28, содержащие LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 или 108.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 26-29, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из SEQ ID NO: 2/10, 22/10, 32/10, 42/50, 62/70, 82/90 или 100/108.

31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 42/50.

32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 100/108.

33. Антитело, которое связывается с TMPRSS6, причем антитело содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 30, 40, 58, 78, 96 и 114.

34. Антитело по п. 33, в котором легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 60, 80, 98 и 116.

35. Антитело по п. 33 или п. 34, содержащее пару аминокислотных последовательностей HC/LC, выбранную из SEQ ID NO: 18/20, 30/20, 40/20, 58/60, 78/80, 96/98 или 114/116.

36. Антитело по п. 35, содержащее пару аминокислотных последовательностей HC/LC 58/60.

37. Антитело по п. 35, содержащее пару аминокислотных последовательностей HC/LC 114/116.

38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-37, причем антитело имеет одно или более свойств, выбранных из следующих:

(a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;

(b) связывается с TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее около 21,2 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса;

(c) связывается с TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C с K_D менее около 25,7 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса;

(d) связывается с TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C с K_D менее около 703 нМ, как измеряется в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса;

(e) связывается с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 человека с EC_{50} менее около 2,7 нМ;

(f) связывается с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 обезьяны, с EC_{50} менее около 3,6 нМ;

(g) связывается с клетками, экспрессирующими TMPRSS6 мыши с EC_{50} менее около 35 нМ;

(h) ингибирует протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 человека, например, ингибирует TMPRSS6 человека с процентом ингибирования более около 90%;

(i) ингибирует протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 человека, например, ингибирует TMPRSS6 человека и имеет IC_{50} менее около 200 пМ;

(j) ингибирует протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 мыши, например, ингибирует TMPRSS6 мыши, при этом процент ингибирования составляет более около 42%;

(k) ингибирует протеазозависимое высвобождение гемоювелина клеточной поверхности в присутствии TMPRSS6 мыши, например, ингибирует TMPRSS6 мыши и демонстрирует IC_{50} менее около 274 пМ;

(l) ингибирует TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 65%;

(m) ингибирует TMPRSS6 человека при 25°C и при 37°C и демонстрирует IC_{50} менее около 10 нМ;

(n) ингибирует TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 66%;

(o) ингибирует TMPRSS6 обезьяны при 25°C и при 37°C и демонстрирует IC_{50} менее около 50 нМ;

(p) ингибирует TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C с процентом ингибирования более около 58%;

(q) ингибирует TMPRSS6 мыши при 25°C и при 37°C и демонстрирует IC_{50} менее около 35 нМ;

(r) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, снижает уровень сывороточного железа у субъекта;

(s) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышает уровни сывороточного гепсидина у субъекта;

(t) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышает уровни зрелых эритроцитов у субъекта;

(u) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышает уровни зрелых эритроцитов в селезенке и/или костном мозге субъекта;

(v) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышает уровень гемоглобина у субъекта; или

(w) при введении субъекту, нуждающемуся в этом, снижает уровень насыщения трансферрина у субъекта.

39. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-38, причем антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с TMPRSS6 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-38.

41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-38.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с TMPRSS6 по любому из пп. 1-41, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

43. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-41.

44. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-41.

45. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п. 43 и/или полинуклеотидную последовательность по п. 44.

46. Набор векторов, содержащий первый вектор, содержащий полинуклеотид по п. 43, и второй вектор, содержащий полинуклеотид по п. 44.

47. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 45 или набор векторов по п. 46.

48. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с TMPRSS6, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 47 в условиях, позволяющих продуцировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемых таким образом.

49. Способ по п. 48, дополнительно включающий составление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

50. Способ лечения, предупреждения или облегчения по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или нарушения, ассоциированных с перенасыщением железом, при этом способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-41 субъекту, нуждающемуся в этом.

51. Способ по п. 50, в котором заболевание или нарушение представляет собой врожденную дизэритропоэтическую анемию, анемию Даймонда - Блэкфана, альфа-талассемию, бета-талассемию, трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию, миелодиспластический синдром, серповидно-клеточную анемию, истинную полицитемию, наследственный гемохроматоз или хроническую болезнь печени.

52. Способ по п. 51, в котором заболевание или нарушение представляет собой бета-талассемию.

53. Способ по п. 52, в котором заболевание или нарушение представляет собой большую бета-талассемию или промежуточную бета-талассемию.

54. Способ по п. 51, в котором заболевание или нарушение представляет собой миелодиспластический синдром.

55. Способ по п. 54, в котором заболевание или нарушение представляет собой миелодиспластический синдром с кольцевыми сидеробластами.

56. Способ по п. 51, в котором заболевание или нарушение представляет собой трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию.

57. Способ по п. 56, в котором заболевание или нарушение представляет собой трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию вследствие дефицита пируваткиназы или сидеробластную трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию.

58. Способ по п. 51, в котором заболевание или нарушение представляет собой хроническое заболевание печени.

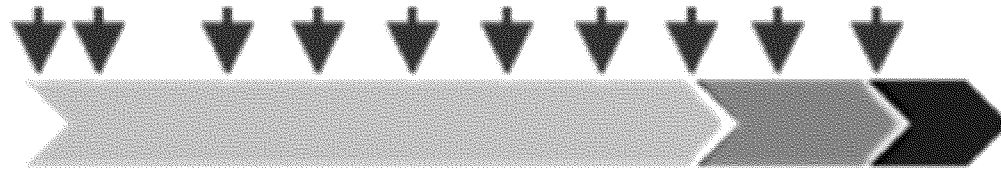
59. Способ по п. 58, в котором заболевание или нарушение представляет собой связанное с употреблением алкоголя хроническое заболевание печени, гепатит С или аутоиммунный гепатит.

60. Способ по любому из пп. 50-59, в котором фармацевтическую композицию вводят в качестве профилактики или терапии субъекту, нуждающемуся в этом.

61. Способ по любому из пп. 50-60, в котором фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутривнутрино или внутримышечно.

По доверенности

Самцы мышей $Hbb^{th3/+}$ в возрасте 4-8 недель
Еженедельная инъекция МАВ (8 недель)
Первая неделя: инъекции в день 0 и 3

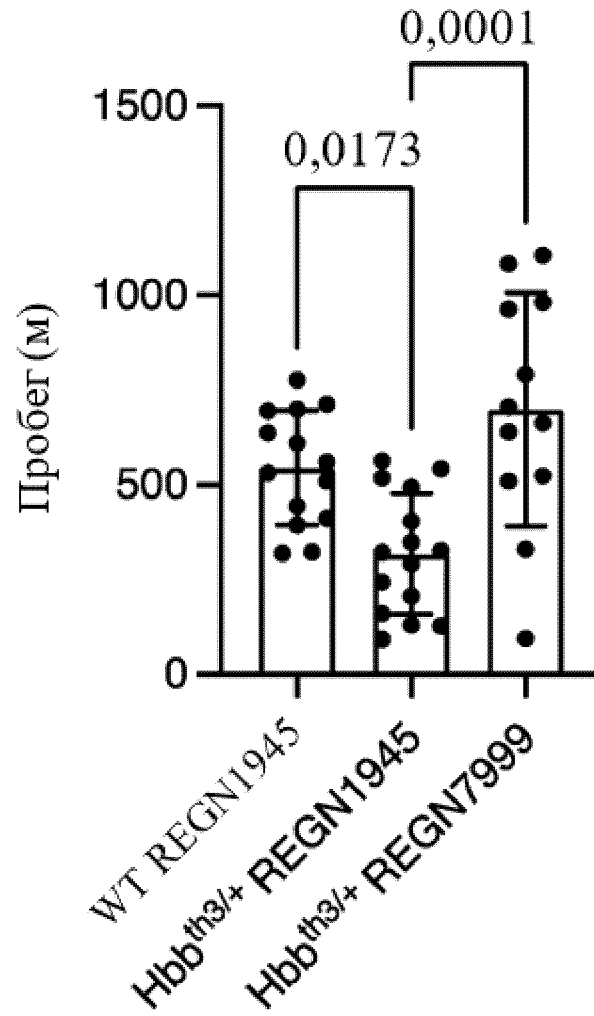


Неделя: 0

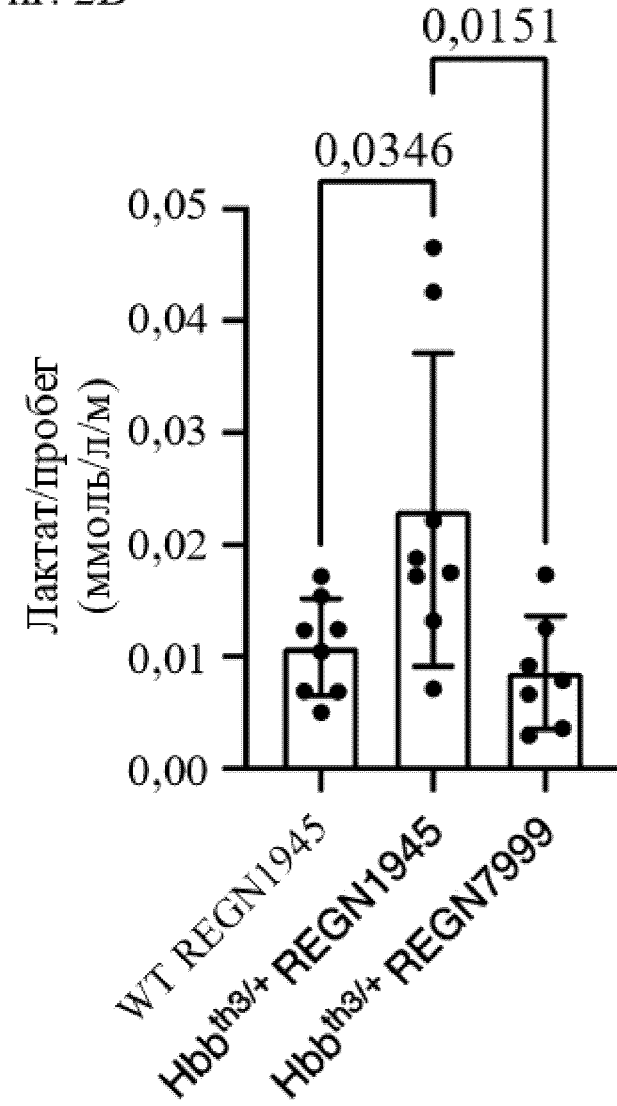


Фиг. 1

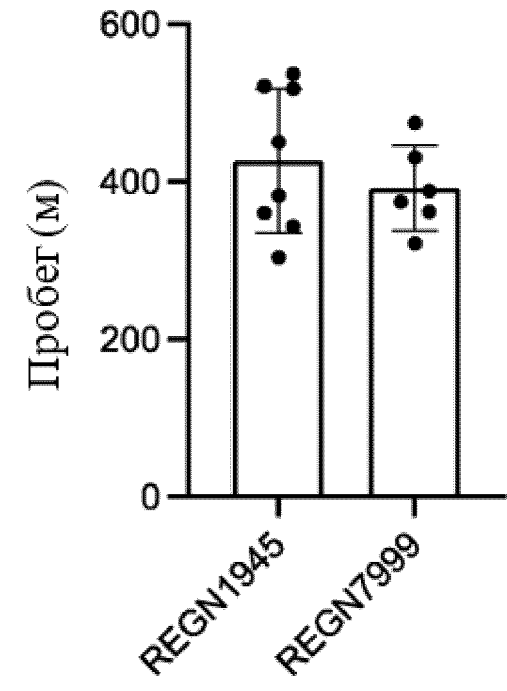
Фиг. 2А



Фиг. 2В

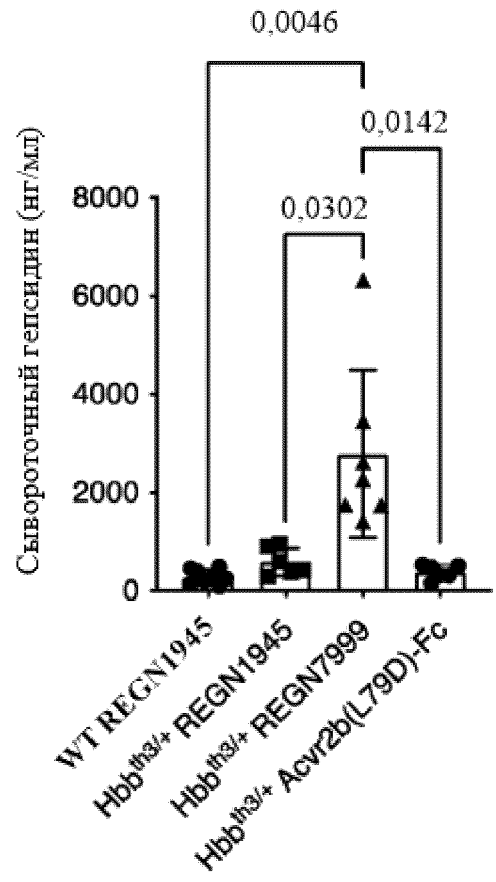


Мыши дикого типа

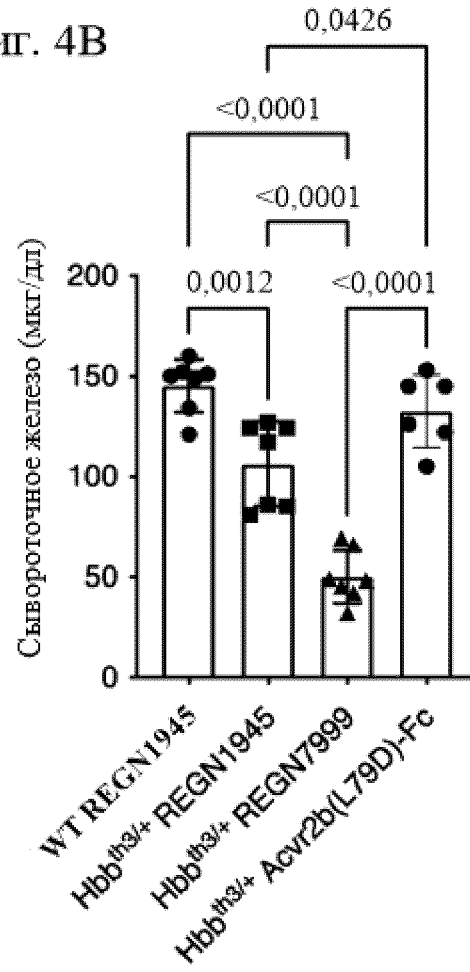


Фиг. 3

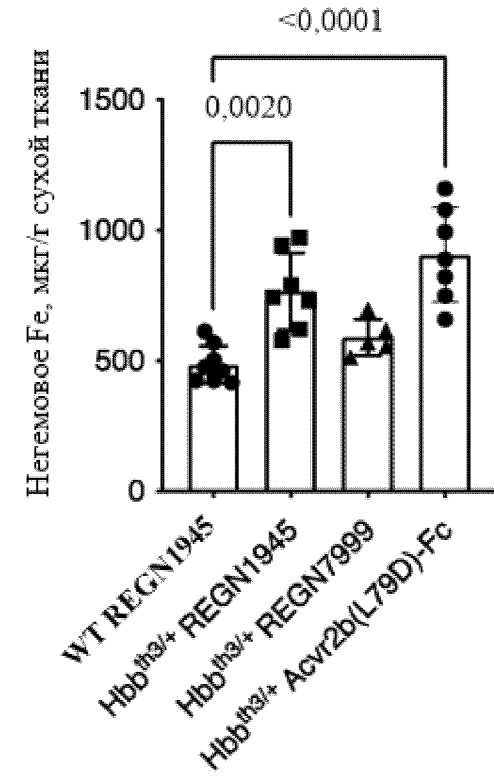
Фиг. 4А

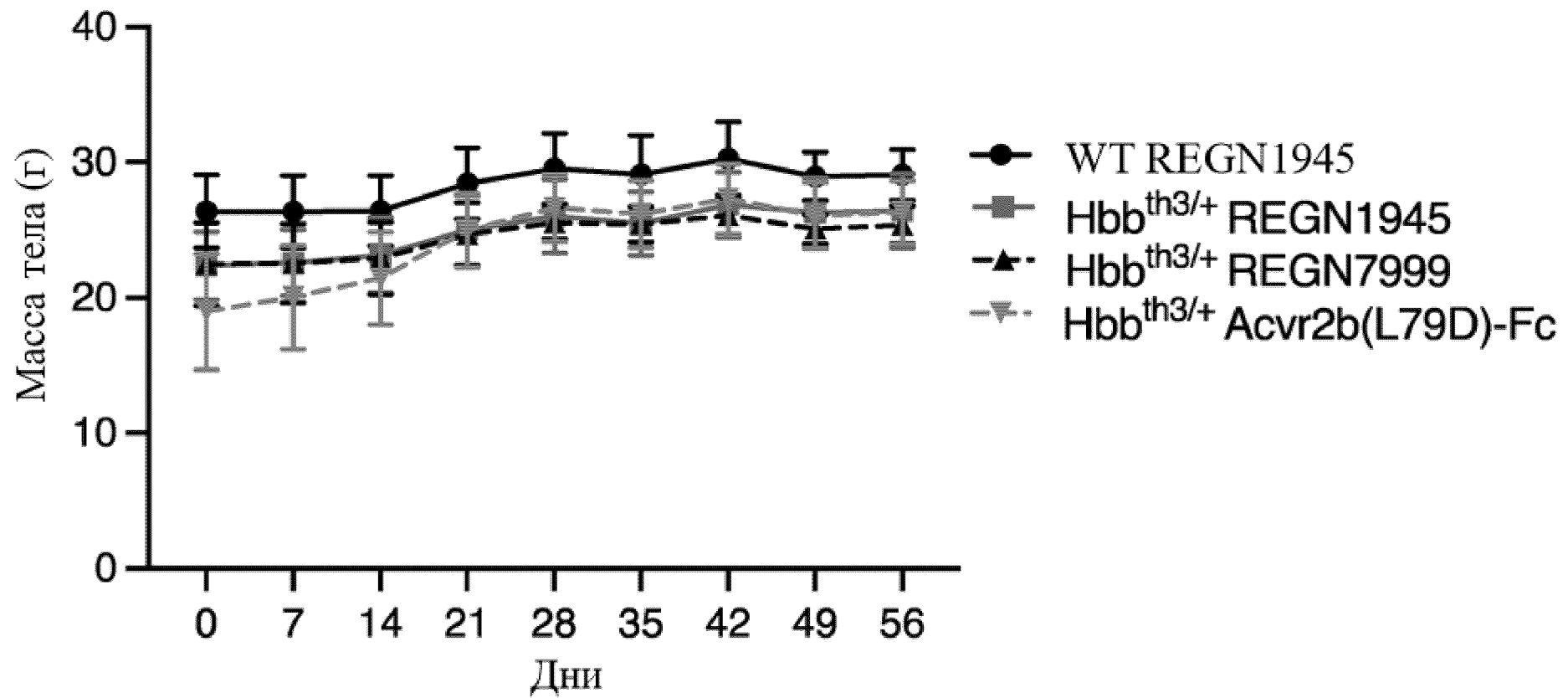


Фиг. 4В

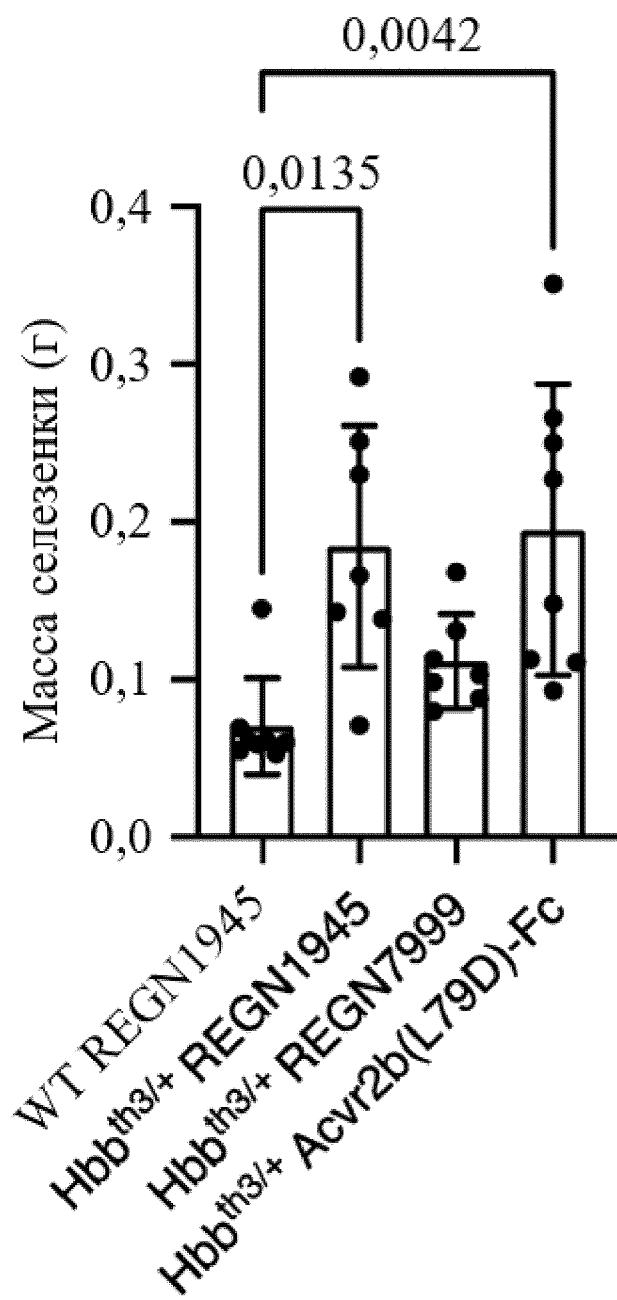


Фиг. 4С

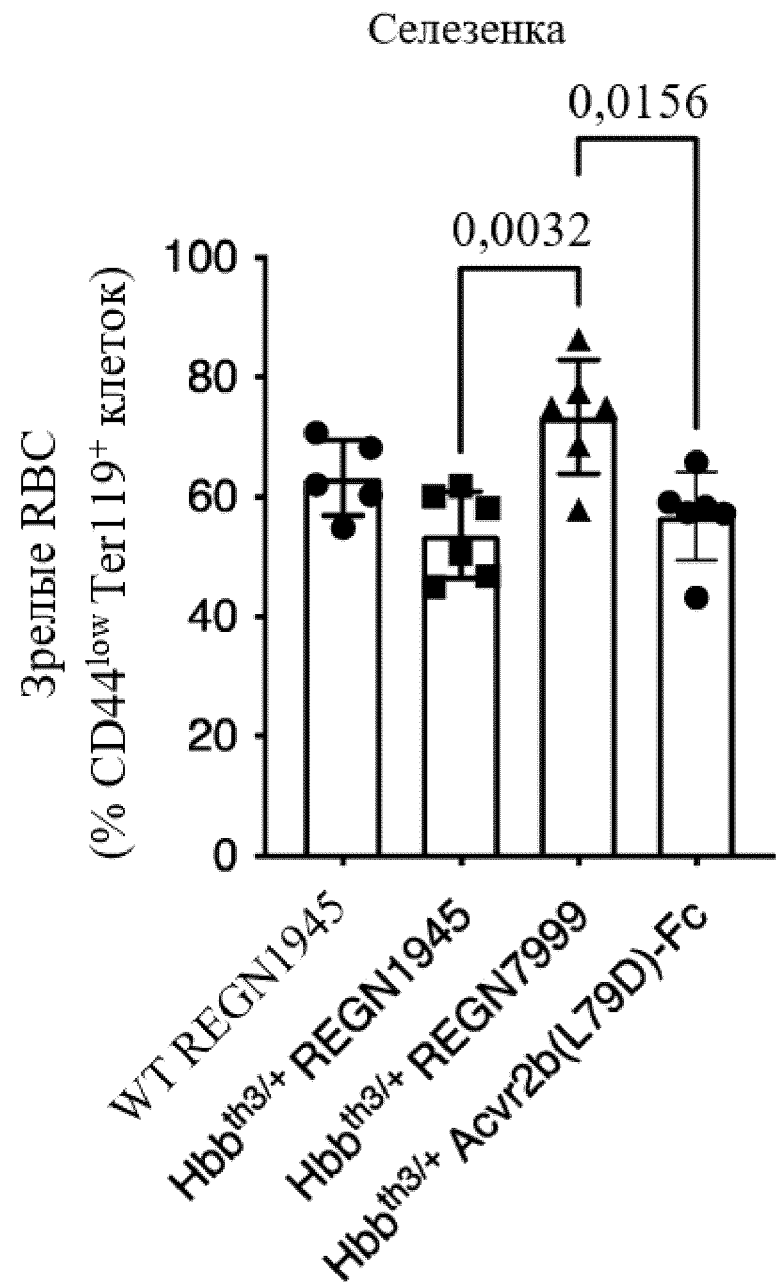




Фиг. 5

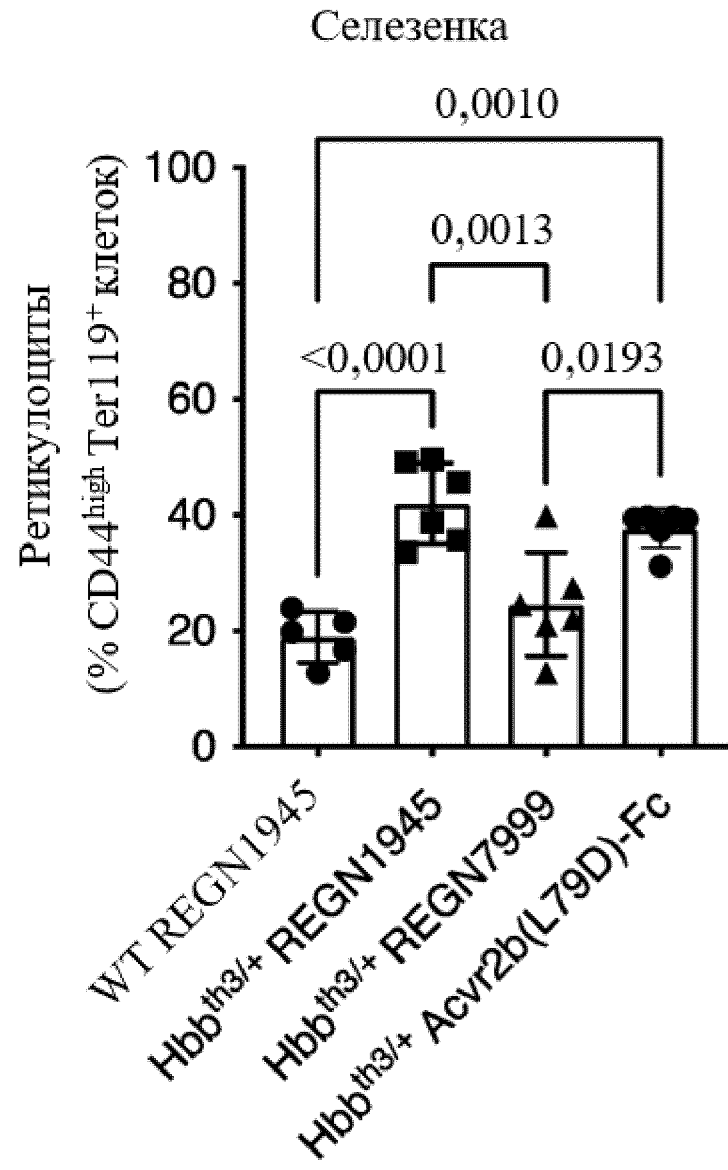


Фиг. 6



8/8

Фиг. 7



Фиг. 8