

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491334 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.23

(51) Int. Cl. *A61K 39/39* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.23

(54) АНТИТЕЛА К NGF И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/282,590; 63/383,173

(32) 2021.11.23; 2022.11.10

(33) US

(86) PCT/US2022/080428

(87) WO 2023/097275 2023.06.01

(71) Заявитель:
ИНВТЕКС, ИНК. (US)

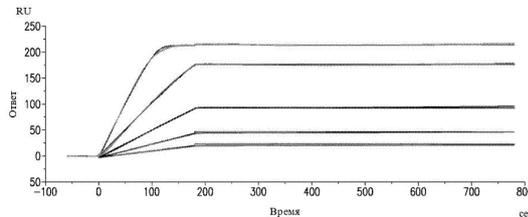
(72) Изобретатель:

Брондик Уильям, Уиллис Джордан,
Севины Лейла (US)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) В изобретении предложены новые белки, антитела к NGF и их NGF-связывающие фрагменты, которые ингибируют ассоциацию NGF с TrkA и/или p75 и подходят для введения субъектам-животным семейства собачьих или кошачьих. Изобретение также предлагает новые композиции и способы лечения боли или достижения анальгетического эффекта у субъектов-животных семейства собачьих или кошачьих, включающие введение эффективного количества белка, антитела к NGF или их фрагмента. Способы и композиции применяют для лечения или профилактики связанных с NGF расстройств.



202491334
A1

202491334
A1

АНТИТЕЛА К NGF И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Родственные заявки и включение путем ссылки

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США с серийным номером № 63/282590, поданной 23 ноября 2021 г., и предварительной заявки на патент США с серийным номером № 63/383173, поданной 10 ноября 2022 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Все документы, цитируемые или упомянутые в настоящем документе («документы, цитируемые в данном документе»), а также все документы, цитируемые или упомянутые в документах, цитируемых в данном документе, вместе с любыми инструкциями производителя, описаниями, спецификациями продуктов и листами продуктов для любых продуктов, упомянутых в настоящем документе или в любом документе, включенном в настоящий документ посредством ссылки, включены в настоящий документ посредством ссылки и могут быть использованы при осуществлении изобретения. Более конкретно, все ссылочные документы включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был конкретно и индивидуально указан как включенный посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, который представлен в формате ASCII посредством EFS-Web и полностью включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 22 ноября 2022 г., называется G9432-99003.xml и имеет размер 292 984 байта.

Область техники изобретения

В изобретении предложены новые белки, антитела к NGF и их NGF-связывающие фрагменты, которые ингибируют ассоциацию NGF с TrkA и/или p75 и подходят для введения субъектам-животным семейства собачьих или кошачьих. Изобретение также предлагает новые композиции и способы лечения боли или достижения анальгетического эффекта у субъектов-животных семейства собачьих или кошачьих, включающие введение эффективного количества белка, антитела к NGF или их фрагмента. Способы и композиции применяют для лечения или профилактики связанных с NGF расстройств.

Уровень техники изобретения

Фактор роста нервов (NGF) имеет решающее значение для развития и поддержания периферических симпатических и эмбриональных сенсорных нейронов, а также холинергических нейронов базального отдела переднего мозга. NGF усиливает

экспрессию нейропептидов в сенсорных нейронах, и его активность опосредуется двумя разными мембраносвязанными рецепторами. Несколько нейротропинов (NT), включая NGF, связываются с низкоаффинным рецептором, идентифицированным как p75. NGF избирательно связывается с высокоаффинным рецептором нейротрофина TrkA и проявляет к нему высокую аффинность.

При связывании нейротрофина TrkA подвергается аутофосфорилированию, а также фосфорилирует участников пути MAPK. Присутствие этой киназы приводит к дифференцировке клеток и может играть роль в определении подтипов сенсорных нейронов.

NGF играет роль в ряде заболеваний и расстройств, включая, помимо прочего, боль, связанную с широким спектром заболеваний и расстройств, таких как боль, связанная с раком, невропатическая боль и нейрогенная боль. В связи с вовлечением NGF в широкий спектр заболеваний и расстройств, связанных с болью, в данной области техники существует потребность в композициях и способах, полезных для профилактики или лечения заболеваний и расстройств, связанных с NGF, особенно тех, которые связаны с болью, в том числе у животных семейства собачьих, кошачьих и других животных. Особенно предпочтительными композициями к NGF являются те, которые имеют минимальные или сведенные к минимуму нежелательные реакции, такие как воспаление, при введении субъекту.

Цитирование или идентификация любого документа в этой заявке не является признанием того, что такой документ доступен в качестве предшествующего уровня техники для настоящего изобретения.

Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение предлагает новый связывающий белок к NGF для лечения или облегчения заболеваний, связанных с NGF, особенно адаптированный для применения у собак и кошек, но не ограничивающийся этим.

Изобретение обеспечивает связывающие белки, которые специфически связываются с NGF. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки оптимизированы для введения животным семейства собачьих. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки оптимизированы для введения животным семейства кошачьих.

В одном аспекте изобретение относится к связывающим белкам, сконструированным или адаптированным для связывания NGF подобно антителу, т.е. с помощью одной или более определяющих комплементарность областей (CDR). CDR можно идентифицировать с помощью международной информационной системы

ImMunoGeneTics (IMGT). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит один или более из (а) определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO:146), где X_1 включает A, G или N, X_2 включает L или M, X_3 включает A, D, E или S, X_4 включает F, I, L, M или V, X_5 включает N или T, X_6 включает E, S или T, X_7 включает G, H, N, S или Q, и X_8 включает A или S; (b) определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность $X_1X_2SNX_5GT$ (SEQ ID NO:147), где X_1 включает I или L, X_2 включает W или Y, и X_5 включает G или R; (c) определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность $AX_2IX_4X_5YX_7X_8X_9Y LX_{12}X_{13}YX_{15}X_{16}X_{17}$ (SEQ ID NO:148), где X_2 включает D, E, K, N, Q, S или T, X_4 включает W или Y, X_5 включает F, H, W или Y, X_7 включает D или E, X_8 включает A или S, X_9 включает D или Y, X_{12} включает H или Y, X_{13} включает F или W, X_{15} включает F, I, L, W или Y, X_{16} включает D или Q, и X_{17} включает F, I, L, M, W или Y; (d) определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность $X_1X_2IX_4X_5X_6$ (SEQ ID NO:149), где X_1 включает D, E или K, X_2 включает A, G или N, X_4 включает G, N, Q или S, X_5 включает N или S, X_6 включает A, G, N, S или T; (e) определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность AX_2X_3 (SEQ ID NO:150), где X_2 включает A, S или T, X_3 включает A, D, E, N, Q, S или T; и (f) определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность $QX_2GX_4X_5X_6PX_8T$ (SEQ ID NO:151), где X_2 включает H или Q, X_4 включает F, H, W или Y, X_5 включает K или Q, X_6 включает F или W, и X_8 включает L или M.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO:152), где X_1 включает A или G, X_2 включает L или M, X_3 включает E или S, X_4 включает F или L, X_5 включает N или T, X_6 включает E, S или T, X_7 включает H, N или S, и X_8 включает A или S; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность X_1WSNX_5GT (SEQ ID NO:153), где X_1 включает I или L, X_5 включает G или R; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $AX_2IY Y Y X_7ADY LHX_{13}YX_{15}DX_{17}$ (SEQ ID NO:154),

где X_2 включает N, Q, S или T, X_7 включает D или E, X_{13} включает F или W, X_{15} включает F, I, L, W или Y, и X_{17} включает F, I, L или M; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1GIX_4X_5X_6$ (SEQ ID NO:155), где X_1 включает D или E, X_4 включает N, Q или S, X_5 включает N или S, X_6 включает G, N, S или T; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность ATX_3 (SEQ ID NO:156), где X_3 включает D, E, N, Q или S; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $QQGX_4X_5X_6PX_8T$ (SEQ ID NO:157), где X_4 включает F, H, W или Y, X_5 включает K или Q, X_6 включает F или W, и X_8 включает L или M.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR1 тяжелой цепи, представленную на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR2 тяжелой цепи, представленную на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR3 тяжелой цепи, представленную на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR1 легкой цепи, представленную на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR2 легкой цепи, представленную на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR3 легкой цепи, представленную на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, представленную на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит переменный домен тяжелой цепи (V_H), на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичный домену V_H , представленному на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR легкой цепи переменного домена легкой цепи, представленной на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит переменный домен легкой цепи (V_L), на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичный переменному домену легкой цепи, представленному на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит V_H и V_L из F_V , представленных на фиг. 1 и фиг. 2.

На фиг. 1 и фиг. 2 CDR соответствуют системе IMGT. Альтернативно, CDR можно идентифицировать в соответствии с системой нумерации Kabat или системой нумерации

Chothia. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит один или более из VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 в соответствии с системой нумерации Kabat или Chothia, как далее изложено в данном документе.

При спаривании доменов V_H и V_L , описанном в настоящем документе, любой домен V_H можно использовать с любым доменом V_L . Аналогично, CDR любого домена V_H можно использовать с CDR любого домена V_L . В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит CDR V_H с SEQ ID NO:137 (SC-42_101) и CDR V_L с SEQ ID NO:3 (SC-42_006). В варианте осуществления, который содержит аминокислоту аргинин в положении 55 в VH-CDR2, антитело по изобретению содержит CDR V_H с SEQ ID NO: 207 (SC-42_101R) и CDR V_L с SEQ ID NO: 3 (SC-42_006).

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению включает домены V_H и V_L , которые были выбраны вместе, т.е. идентифицированы в одном и том же клоне. Клоны V_H и V_L , выбранные вместе, идентифицированы как имеющие одно и то же название клона на фиг. 1, как на фиг. 2. Аналогично, CDR домена V_H , идентифицированные по названию клона на фиг. 1, могут использоваться с CDR домена V_L , идентифицированными тем же названием клона, что и на фиг. 2. Парные домены V_H и V_L могут дополнительно содержать консервативные замены, такие как, помимо прочего, консервативные вариации, наблюдаемые в конкретных положениях CDR V_H и CDR V_L , положениях, смежными с CDR V_H и V_L , и положениях доменов V_H и доменов V_L , изложенных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит CDR V_H и V_L клона 2166, SC-42_006, SC-42_007, SC-42_008, SC-42_010, SC-42_011, SC-42_023, SC-42_032, SC-42_045, SC-42_047, SC-42_048, SC-42_052, SC-42_070, SC-42_073, SC-42_077, SC-42_082, SC-42_090 или SC-42_101 (фиг. 1 и фиг. 2).

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению содержит домены V_H и V_L , на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичные доменам клона 2166, SC-42_006, SC-42_007, SC-42_008, SC-42_010, SC-42_011, SC-42_023, SC-42_032, SC-42_045, SC-42_047, SC-42_048, SC-42_052, SC-42_070, SC-42_073, SC-42_077, SC-42_082, SC-42_090 или SC-42_101.

В некоторых вариантах осуществления фелизированный связывающий белок к NGF содержит (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1LX_3X_4X_5X_6X_7X_8MX_{10}$ (SEQ ID NO:208), где X_1 включает A, G, L, N или Q, X_3 включает A, D, E, G, H, I, M, S, T или Y,

X₄ включает L, M или V, X₅ включает A, M, N, R, S, T или V, X₆ включает A, E, G, H, K, R, S или T, X₇ включает A, D, H, I, N, Q, S, T или Y, X₈ включает A или S, и X₁₀ включает S или V; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅GTX₈YX₁₀DX₁₂VX₁₄ (SEQ ID NO:209), где X₁ включает I или L, X₂ включает W или Y; X₃ включает A, P или S, X₄ включает D, E, N, Q, R или S, X₅ включает G, R или Y, X₈ включает D или Y, X₁₀ включает D, E, H, S или T, X₁₂ включает D или S, и X₁₄ включает D, E или K; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀LX₁₂X₁₃X₁₄FX₁₆X₁₇ (SEQ ID NO:210), где X₁ включает A, D, E, K, N, Q, S или T, X₂ включает A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или Y, X₃ включает I, L, W или Y, X₄ включает F, T, W или Y, X₅ включает F, H или Y, X₆ включает H или Y, X₇ включает D или E, X₈ включает A, S или V, X₉ включает D, E, H, K, N, Q или Y, X₁₀ включает F, H или Y, X₁₂ включает H или Y, X₁₃ включает F или W, X₁₄ включает D, I, L, W или Y, X₁₆ включает D или Q, и X₁₇ включает E, F, H, I, L, M, N, P, W или Y; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность X₁ASX₄X₅X₆X₇X₈X₉LX₁₁ (SEQ ID NO:211), где X₁ включает F или R, X₄ включает E, K или N, X₅ включает A или G, X₆ включает I, L или V, X₇ включает A, D, G, L, P, Q, S, V или Y, X₈ включает K, Q, N, S или Y, X₉ включает A, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, S или T, и X₁₁ включает A, G или S; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AX₂X₃X₄X₅X₆X₇ (SEQ ID NO:212), где X₂ включает A, D, L, Q, S, T, V или Y, X₃ включает D, E, K, N, Q или S, X₄ включает H, I, K, L, M, N или V; X₅ включает H или L, X₆ включает H, I, L или M, и X₇ включает D, E, N, S или T; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QQX₃X₄X₅X₆X₇X₈T (SEQ ID NO:213), где X₃ включает G или Y, X₄ включает D, F, G, H, K, L, R, S, T, V, W или Y, X₅ включает E, K, Q, R или S, X₆ включает I, F, T или W, X₇ включает E или P, и X₈ включает L, M или W.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR1 тяжелой цепи, представленную на фиг. 17А. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR2 тяжелой цепи, представленную на фиг. 17А. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR3 тяжелой цепи, представленную на фиг. 17А. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR1 легкой цепи, представленную на фиг. 17В. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR2 легкой цепи, представленную на фиг. 17В. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок

к NGF содержит CDR3 легкой цепи, представленную на фиг. 17B.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR тяжелой цепи варибельного домена тяжелой цепи, представленную на фиг. 17A.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит варибельный домен тяжелой цепи (V_H), на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичный домену V_H , представленному на фиг. 17A.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR легкой цепи варибельного домена легкой цепи, представленной на фиг. 17B.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит варибельный домен легкой цепи (V_L), на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичный варибельному домену легкой цепи, представленному на фиг. 17B.

CDR V_H , представленные на фиг. 17A, может использоваться с CDR V_L , представленными на фиг. 17B, в любой комбинации. Домены V_H , представленные на фиг. 17A, могут использоваться с доменами V_L , представленными на фиг. 17B, в любой комбинации. В таблице 11 и таблице 12 представлены примерные комбинации.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит V_H и V_L из F_V , V_H которого представлен на фиг. 17A и V_L которого представлен на фиг. 17B.

На фиг. 17 CDR соответствуют системе IMGT. Альтернативно, CDR можно идентифицировать в соответствии с системой нумерации Kabat или системой нумерации Chothia. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит один или более из VH -CDR1, VH -CDR2, VH -CDR3, VL -CDR1, VL -CDR2 и VL -CDR3 в соответствии с системой нумерации Kabat или Chothia, или IMGT, как далее изложено в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR, как описано выше, с дополнительным ограничением, что каждая из CDR содержит не более чем одно или два различия в аминокислотах по сравнению с тяжелыми и легкими цепями конкретного антитела, описанными в настоящем документе, например, CDR тяжелой и легкой цепей, последовательности которых представлены на фиг. 1, фиг. 2, фиг. 17A и фиг. 17B, которые имеют сходную последовательность и связываются с NGF с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR V_H и V_L , описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит не более одного или двух аминокислотных различий на CDR по сравнению со тяжелыми и легкими цепями

специфически канинизированного антитела, описанными в настоящем документе, например, CDR тяжелой и легкой цепей, представленных на фиг. 1 и фиг. 2, которые имеют сходную последовательность и связываются с NGF с наивысшей аффинностью. Такие антитела включают антитела, которые содержат не более двух (2) изменений в VH-CDR, т.е. 2, 1 или отсутствие изменений на CDR по сравнению с SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:137 или SEQ ID NO:141, и не более двух (2) изменений в VL-CDR, т.е. 2, 1 или отсутствие изменений на CDR по сравнению с SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит не более одного или двух аминокислотных различий на CDR по сравнению с тяжелыми и легкими цепями специфического фелинизированного антитела, описанными в настоящем документе, например, CDR тяжелой и легкой цепей, представленных на фиг. 17A и фиг. 17B, которые имеют сходную последовательность и связываются с NGF с наивысшей аффинностью. Такие антитела включают антитела, которые содержат не более двух (2) изменений в VH-CDR, т.е. 2, 1 или отсутствие изменений на CDR по сравнению с SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205 или SEQ ID NO:206, и не более двух (2) изменений в VL-CDR, т.е. 2, 1 или отсутствие изменений на CDR по сравнению с SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201 или SEQ ID NO:203.

Мутации и их комбинации внутри CDR и среди CDR, включая разрешенные мутации и выгодные мутации, очевидны из наборов данных последовательностей, показанных на фиг. 1, фиг. 2, фиг. 17A и фиг. 17B. Например, сравнивая вариабельность последовательности или ее отсутствие в различных положениях CDR в наборах данных в целом, можно наблюдать местоположения CDR, в которых определенные аминокислоты предпочтительны для связывания. Аналогично, сравнивая вариабельность последовательностей между цепями V_H или между цепями V_L одной и той же зародышевой линии, можно наблюдать местоположения CDR, в которых аминокислотные изменения могут быть кооперативными. Набор данных также позволяет

идентифицировать положения CDR, которые могут иметь решающее значение для связывания.

Некоторые антитела, описанные в настоящем документе, были выбраны из библиотек животных семейства собачьих или кошачьих на основании сходства последовательностей CDR с другими антителами к NGF. Соответственно, как CDR, так и FR являются собачьими или кошачьими, и будет наблюдаться некоторая степень единообразия между тяжелыми и легкими цепями антител, возникающими из одной и той же последовательности зародышевой линии. Понятно, что такое единообразие является не необходимостью, а следствием используемых способов канинизации и фелинизации. Также понятно, что значительная степень вариабельности последовательностей допускается или может быть введена в FR, что не оказывает вредного воздействия на связывание антигена. В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас тяжелой цепи (FR1H+FR2H+FR3HH), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный тяжелой цепи, представленной на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас тяжелой цепи (FR1H+FR2H+FR3H+FR4H), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:137 или SEQ ID NO:141.

В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас тяжелой цепи (FR1H+FR2H+FR3HH), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный тяжелой цепи, представленной на фиг. 17A. В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас тяжелой цепи (FR1H+FR2H+FR3H+FR4H), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205 или SEQ ID NO:206.

В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас легкой цепи (FR1+FR2+FR3+FR4), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по

меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный легкой цепи, представленной на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас легкой цепи (FR1L+FR2L+FR3L+FR4L), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас легкой цепи (FR1+FR2+FR3+FR4), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный легкой цепи, представленной на фиг. 17B. В некоторых вариантах осуществления белок к NGF содержит каркас легкой цепи (FR1L+FR2L+FR3L+FR4L), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201 или SEQ ID NO:203.

Обсуждение естественно консервативных сетей аминокислот, которые поддерживают функцию V(H) и V(L) антитела, см., например, в Wang et al., Conserved amino acid networks involved in antibody variable domain interactions. *Proteins* 2009 Jul;76(1):99-114. Wang идентифицирует консервативные и неконсервативные пары аминокислот в доменах V_H и V_L антител, интерфейсе переменного-константного домена V_H-C_{H1}, а также в доменах V_{HH} верблюдовых, которые в ходе эволюции лишились взаимодействия с V_L и C_{H1}. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят для оптимизации биофармацевтических и биофизических свойств, таких как эффективность, безопасность, технологичность и стабильность терапевтических антител. См., например, Douillard et al., Optimization of an Antibody Light Chain Framework Enhances Expression, Biophysical Properties and Pharmacokinetics. *Antibodies (Basel)* 2019 Sep 6;8(3):46.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает выделенный рекомбинантный NGF-связывающий белок, в котором переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную переменному домену тяжелой цепи, представленному на фиг. 1. В

некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133 или SEQ ID NO:137.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к выделенному рекомбинантному NGF-связывающему белку, в котором вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную вариабельному домену легкой цепи, представленному на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134 или SEQ ID NO:138.

В другом аспекте изобретение обеспечивает нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок к NGF по изобретению. В другом аспекте изобретение предлагает вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок к NGF по изобретению.

В другом аспекте изобретение относится к клетке, которая содержит нуклеиновую кислоту вектора по изобретению или экспрессирует белок к NGF по изобретению.

Связывающие белки к NGF такие как, помимо прочего, антитела и фрагменты антител, специфически связывают NGF, который ингибирует ассоциацию NGF с TrkA и дополнительно ингибирует ассоциацию NGF с p75. В некоторых вариантах осуществления эти новые связывающие белки к NGF подходят для обнаружения NGF и для лечения боли и связанных с болью расстройств и состояний, например, боли, связанной с воспалением, раком, специфической боли и расстройств, связанных с воспалением, особенно расстройств, связанных с болью, связанных с повышенными уровнями NGF, и их можно вводить отдельно или в сочетании с другим активным агентом, таким как, помимо прочего, другой биологический препарат, NSAID или опиоидный анальгетик.

Соответственно, целью изобретения является не включать в изобретение какой-либо ранее известный продукт, процесс изготовления продукта или способ использования продукта, так что заявители оставляют за собой право и настоящим исключают любой ранее известный продукт, процесс или способ. Далее следует отметить, что изобретение

не претендует на включение в объем изобретения какого-либо продукта, процесса или изготовления продукта или способа использования продукта, который не соответствует письменному описанию и требованиям USPTO (35 U.S.C. §112, первый абзац) или ЕПВ (статья 83 ЕПК), так что заявители оставляют за собой право и настоящим исключают любой ранее описанный продукт, процесс изготовления продукта или способ использования продукта. При осуществлении изобретения может оказаться выгодным соблюдение требований ст. 53(с) ЕПК и Правила 28(b) и (с) ЕПК. Все права на явное исключение любых вариантов осуществления, которые являются объектом любого выданного патента(ов) заявителя в «родословной» настоящей заявки или в любой другой «родословной», или в любой ранее поданной заявке любой третьей стороны, явно защищены. Ничто в данном документе не может быть истолковано как обещание.

Следует отметить, что в этом описании и, в частности, в формуле изобретения и/или абзацах такие термины, как «содержит», «содержащийся», «содержащий» и т.п., могут иметь значение, приписываемое им патентным законодательством США; например, они могут означать «включает», «включенный», «включающий» и т.п.; и что такие термины, как «состоящий по существу из» и «состоит по существу из» имеют значение, приписываемое им патентным законодательством США, например, они допускают элементы, не указанные явно, но исключают элементы, которые встречаются в предшествующем уровне техники или которые влияют на основные или новые характеристики изобретения.

Эти и другие варианты осуществления описаны или очевидны из следующего подробного описания и включены в него.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1B показано выравнивание аминокислотных последовательностей типичных переменных доменов тяжелой цепи V_H по изобретению. Выровненные переменные домены разделены на две части: часть (A) показывает N-концевую область, а часть (B) показывает C-концевую область. В целях выравнивания каркасы (FR) и определяющие комплементарность области (CDR) идентифицируются в соответствии с системой IMGT. CDR и FR могут быть картированы в соответствии с другими системами, описанными в настоящем документе.

На фиг. 2A-2B показано выравнивание аминокислотных последовательностей типичных переменных доменов легкой цепи V_L по изобретению. Выровненные переменные домены разделены на две части: часть (A) показывает N-концевую область, а часть (B) показывает C-концевую область. В целях выравнивания каркасы (FR) и определяющие комплементарность области (CDR) идентифицируются в соответствии с

системой IMGT. CDR и FR могут быть картированы в соответствии с другими системами, описанными в настоящем документе. Каждый из доменов V_L подходит для спаривания с любым из доменов V_H , показанных на фиг. 1. Вместе с фиг. 1, названия клонов указывают на выбор типичных пар V_H-V_L , которые были протестированы на наличие связывания.

На фиг. 3 показано ингибирование пролиферации клеток TF-1.

На фиг. 4 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи (SEQ ID NO: 144) и легкой цепи (SEQ ID NO: 145) химерного антитела 2166. Изменения двух остатков («AA», подчеркнуты и выделены жирным шрифтом) были сделаны в Fc для устранения эффекторной активности. Изменения аналогичны мутации «LALA», описанной для Fc человеческого IgG1. Химерное антитело 2166 содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи каппа IgGB животных семейства собачьих.

На фиг. 5 показана сенсограмма связывания химерного антитела 2166 животных семейства собачьих с NGF животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 0,78, 1,56, 3,12, 6,25 и 12,5 нМ.

На фиг. 6 показана сенсограмма связывания только NGF животных семейства собачьих с p75-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 7 показана сенсограмма связывания только NGF животных семейства собачьих с TrkA-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 8 показана сенсограмма связывания смеси химерного антитела 2166 и NGF животных семейства собачьих с p75-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 9 показана сенсограмма связывания смеси химерного антитела 2166 и NGF животных семейства собачьих с TrkA-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 10 показаны сенсограммы 70 канинизированных клонов, связывающихся с NGF животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 0,23, 0,69, 2,06, 6,17 и 18,52 нМ.

На фиг. 11 показана сенсограмма связывания только NGF животных семейства собачьих с p75-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 12 показана сенсограмма связывания только NGF животных семейства собачьих с TrkA-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF 0,78, 1,56, 3,12,

6,25, 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 13 показана сенсограмма связывания смеси канинизированного антитела SC42_101 и NGF с p75-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 14 показана сенсограмма связывания смеси канинизированного антитела SC42_101 и NGF с TrkA-Fc животных семейства собачьих. Концентрации NGF составляли 12,5, 25 и 50 нМ.

На фиг. 15 показана аминокислотная последовательность V_H (SEQ ID NO: 141) и V_L (SEQ ID NO: 142) фелинизированного антитела к NGF.

На фиг. 16 показана сенсограмма связывания клона 101 животных семейства кошачьих с NGF. Концентрации NGF составляли 1,23, 3,7, 11, 33 и 100 нМ.

На фиг. 17A-17B показано выравнивание аминокислотных последовательностей типичных фелинизированных и фелинизированных с созревшей аффинностью переменных доменов тяжелой цепи V_H (A) и переменных доменов легкой цепи V_L (B) по изобретению. В целях выравнивания каркасы (FR) и определяющие комплементарность области (CDR) идентифицируются в соответствии с системой IMGT. CDR и FR могут быть картированы в соответствии с другими системами, описанными в настоящем документе. См., например, таблицу 4 и CDR, определенные с использованием комбинации методик по Kabat и IMGT.

На фиг. 18A-18H показаны сенсограммы антител животных семейства кошачьих с созревшей аффинностью: (A) клон 101; (B) AHF17602; (C) SC-184_76; (D) SC-184_76-Arg; (E) SC-102; (F) SC-184_102-Arg; (G) SC-110; (H) SC-184_110-Arg. Концентрации NGF составляли 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 и 1,56 нМ.

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии этого патента или этой публикации заявки на патент с цветным графическим материалом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

Следующее подробное описание, предоставленное в качестве примера, но не предназначенное для ограничения изобретения только конкретными описанными вариантами осуществления, можно лучше всего понять в сочетании с сопровождающими графическими материалами.

Подробное описание изобретения

Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения NGF-связывающий белок представляет собой антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент. Термин «антитело», используемый в настоящем

документе, включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). В типичном антителе каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном документе HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно называемую в данном документе LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающимися с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антитела к NGF (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии животных семейства собачьих или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Остатки антител, которые оказывают существенное влияние на аффинность и специфичность связывания с целевым антигеном, преимущественно локализованы в CDR. Kabat et al. собрали и выровняли последовательности тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов и первыми предложили стандартизированную схему нумерации переменных областей иммуноглобулинов, идентифицируя консервативные и гипервариабельные области и остатки. (Kabat EA et al., 1979, Sequences of Immunoglobulin Chains: Tabulation and Analysis of Amino Acid Sequences of Precursors, V-regions, C-regions, J-Chain and BP-Microglobulins, Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health). Хотя система Kabat является широко распространенным стандартом нумерации остатков антител, гипервариабельные области, определенные по Kabat, не совсем соответствуют структурным аспектам антигенсвязывающих петель. Chothia и Lesk разработали структурную схему нумерации путем выравнивания кристаллических структур переменных областей антител и классифицировал петли CDR в небольшом количестве «канонических» классов (Chothia C, et al., 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196:901–17. doi: 10.1016/0022-2836(87)90412-8). Преимущество схемы нумерации

Chothia заключается в том, что топологически выровненные остатки из разных антител локализуются под одним и тем же номером положения, а определение CDR по Chothia в большинстве последовательностей антител соответствует структурной антигенсвязывающей петле. Lefranc представил новую систему, основанную на последовательностях зародышевой линии, предназначенную для стандартизации нумерации всех белков суперсемейства иммуноглобулинов, включая цепи Т-клеточных рецепторов (Giudicelli V et al., 1997, IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 25:206–11), которая затем была распространена на целые переменные домены (Lefranc M-P et al., 2003, IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol.* 27:55–77. doi: 10.1016/S0145-305X(02)00039-3). Были предложены дополнительные системы нумерации для выравнивания нетрадиционных каркасов (Abhinandan KR et al., 2008, Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol.* 45:3832–9. doi: 10.1016/j.molimm.2008.05.022) и подразделения последовательностей переменных цепей на множество фрагментов, включая структурно инвариантные «ядра» (Gelfand et al., 1998, Algorithmic determination of core positions in the V_L and V_H domains of immunoglobulin molecules. *J Comput Biol.* (1998) 5:467–77). В некоторых вариантах осуществления изобретения остатки CDR идентифицируют в соответствии со стандартной системой, изложенной выше. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению идентифицируют по всем или подмножеству остатков CDR по Kabat последовательностей антител, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению идентифицируют по всем или подмножеству остатков CDR по Chothia последовательностей антител, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению идентифицируют по всем или подмножеству остатков CDR по IMGT последовательностей антител, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению идентифицируют по остаткам CDR, определяемым двумя или более системами, включающими, например, но не ограничиваясь ими, все или подмножество остатков VH-CDR1 по Kabat, все или подмножество остатков VH-CDR2 по Chothia, все или подмножество остатков VH-CDR3 по Kabat, все или подмножество остатков VL-CDR1 по Kabat, все или подмножество остатков VL-CDR2 по Kabat, и все или подмножество остатков VL-CDR3 по Chothia. В таблице 1 показано соответствие FR и CDR для последовательностей антител, показанных на фиг. 1 и 2.

Таблица 1. Аминокислоты CDR

	VH-FR1	VH-CDR1	VH-FR2	VH-CDR2	VH-FR3	VH-CDR3	VH-FR4
IMGT	1-25	26-33	34-50	51-57	58-95	96-112	113-123
Kabat	1-30	31-35	36-49	50-65	66-97	98-112	113-123
Chothia	1-25	26-32	33-51	52-56	57-97	98-112	113-123
	VL-FR1	VL-CDR1	VL-FR2	VL-CDR2	VL-FR3	VL-CDR3	VL-FR4
IMGT	1-26	27-32	33-49	50-52	53-88	89-97	98-107
Kabat	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107
Chothia	1-25	26-32	33-49	50-52	53-90	91-96	97-107

Идентификация CDR по Kabat: в некоторых вариантах осуществления канинизированный связывающий белок к NGF содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит одну или более из (а) определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID NO:158), где X_1 включает E, S или T, X_2 включает G, H, N, S или Q, X_3 включает A или S; и X_4 включает I, M или V, и X_5 включает D или S; (b) определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3SNX_6GTX_9YX_{11}X_{12}AX_{14}X_{15}X_{16}$ (SEQ ID NO:159), где X_1 включает V, L, M или T, X_2 включает I или L, X_3 включает W или Y, X_6 включает G или R, X_9 включает D, Q или S, X_{11} включает A, N или T, X_{12} включает D или S, X_{14} включает I или V, X_{15} включает E или K, и X_{16} включает G или S; (c) определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность $IX_2X_3YX_5X_6X_7Y LX_{10}X_{11}YX_{13}X_{14}X_{15}$, (SEQ ID NO:160), где X_2 включает W или Y, X_3 включает F, H, W или Y, X_5 включает D или E, X_6 включает A или S, X_7 включает D или Y, X_{10} включает H или Y, X_{11} включает F или W, X_{13} включает F, I, L, W или Y, X_{14} включает D или Q, и X_{15} включает F, I, L, M, W или Y; (d) определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность $X_1ASX_4X_5IX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO:161), где X_1 включает L или R, X_4 включает D, E или K, X_5 включает A, G или N, X_7 включает G, N, Q или S, X_8 включает N или S, X_9 включает A, G, N, S или T, X_{10} включает L или V, и X_{11} включает A или N; (e) определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность $AX_2X_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID NO:162), где X_2 включает A, S или T, X_3 включает A, D, E, N, Q, S или T, X_4 включает A, E, K, L, N, Q, S или T, X_5 включает L, M или N, X_6 включает A или Q, и X_7 включает G, D, R, S или T; и (f) определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность $X_1X_2GX_4X_5X_6PX_8T$ (SEQ ID NO:163), где X_1 включает H, M Q или R, X_2 включает H, N, Q или S, X_4 включает F, H, W или Y, X_5 включает K или Q, X_6 включает F или W, и X_8 включает L или M.

В некоторых вариантах осуществления канинизированный связывающий белок к

NGF содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4S$ (SEQ ID NO:164), где X_1 включает E, S или T, X_2 включает H или N, X_3 включает A или S, X_4 включает I или M, (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность $TIWSNX_6GTDYX_{11}X_{12}AVKG$ (SEQ ID NO:165), где X_6 включает G или R, X_{11} включает A или T, и X_{12} включает D или S; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $IYYX_5ADYX_{10}X_{11}YX_{13}DX_{15}$ (SEQ ID NO:166), где X_5 включает D или E, X_{10} включает H или Y, X_{11} включает F или W, X_{13} включает F, I, L, W или Y, и X_{15} включает F, I, L или M; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $RASEGIX_7X_8X_9X_{10}A$ (SEQ ID NO:167), где X_7 включает N, Q или S, X_8 включает N или S, X_9 включает G, N, S или T, и X_{10} включает L или V; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность $ATX_3X_4LX_6X_7$ (SEQ ID NO:168), где X_3 включает A, D, E, N, Q или S, X_4 включает E, K, Q или S, X_6 включает A или Q, и X_7 включает R или T; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $QQGX_4X_5X_6PLT$ (SEQ ID NO:169), где X_4 включает F, H, W или Y, X_5 включает K или Q, и X_6 включает F или W.

Идентифицируя CDR согласно Chothia, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF-содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит одну или более из (а) определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID NO:170), где X_1 включает A, G или N, X_2 включает L или M, X_3 включает A, D, E или S, X_4 включает F, I, L, M или V, X_5 включает N или T, X_6 включает E, S или T, и X_7 включает G, H, N, S или Q; (b) определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность X_1SNX_4G (SEQ ID NO:171), где X_1 включает W или Y и X_4 включает G или R; (c) определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность $IX_2X_3YX_5X_6X_7YLX_{10}X_{11}YX_{13}X_{14}X_{15}$, (SEQ ID NO:172), где X_2 включает W или Y, X_3 включает F, H, W или Y, X_5 включает D или E, X_6 включает A или S, X_7 включает D или Y, X_{10} включает H или Y, X_{11} включает F или W, X_{13} включает F, I, L, W или Y, X_{14} включает D или Q, и X_{15} включает F, I, L, M, W или Y; (d) определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащей аминокислотную

последовательность $SX_2X_3IX_5X_6X_7$ (SEQ ID NO:173), где X_2 включает D, E или K, X_3 включает A, G или N, X_5 включает G, N, Q или S, X_6 включает N или S, X_7 включает A, G, N, S или T; (e) определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность AX_2X_3 (SEQ ID NO:174), где X_2 включает A, S или T, и X_3 включает A, D, E, N, Q, S или T; и (f) определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность $GX_2X_3X_4PX_6$ (SEQ ID NO:175), где X_2 включает F, H, W или Y, X_3 включает K или Q, X_4 включает F или W, и X_6 включает L или M.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID NO:176), где X_1 включает A, G или N, X_2 включает L или M, X_3 включает A, E или S, X_4 включает F или L, X_5 включает N или T, X_6 включает E, S или T, и X_7 включает H, N или S; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность $WSNX_4G$ (SEQ ID NO:177), где X_4 включает G или R; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $IYX_3YX_5ADY LX_{10}X_{11}YX_{13}DX_{15}$ (SEQ ID NO:178), где X_3 включает F или Y, X_5 включает D или E, X_{10} включает H или Y, X_{11} включает F или W, X_{13} включает F, I, L, W или Y, и X_{15} включает F, I, L, M, W или Y; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $SX_2GIX_5X_6X_7$ (SEQ ID NO:179), где X_2 включает D или E, X_5 включает N, Q или S, X_6 включает N или S, и X_7 включает G, N, S или T; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность ATX_3 (SEQ ID NO:180), где X_3 включает D, E, N, Q или S; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $GX_2X_3X_4PX_6$ (SEQ ID NO:181), где X_2 включает F, H, W или Y, X_3 включает K или Q, X_4 включает F или W, и X_6 включает L или M.

В другом аспекте изобретение обеспечивает связывающий белок, подходящий для применения у млекопитающего, например, но без ограничения, у животных семейства кошачьих. В некоторых вариантах осуществления фелизированный связывающий белок к NGF содержит (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1LX_3X_4X_5X_6X_7X_8MX_{10}$ (SEQ ID NO:208), где X_1 включает A, G, L, N или Q, X_3 включает A, D, E, G, H, I, M, S, T или Y, X_4 включает L, M или V, X_5 включает A, M, N, R, S, T или V, X_6 включает A, E, G, H, K, R,

S или T, X₇ включает A, D, H, I, N, Q, S, T или Y, X₈ включает A или S, и X₁₀ включает S или V; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅GTX₈YX₁₀DX₁₂VX₁₄ (SEQ ID NO:209), где X₁ включает I или L, X₂ включает W или Y; X₃ включает A, P или S, X₄ включает D, E, N, Q, R или S, X₅ включает G, R или Y, X₈ включает D или Y, X₁₀ включает D, E, H, S или T, X₁₂ включает D или S, и X₁₄ включает D, E или K; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀LX₁₂X₁₃X₁₄FX₁₆X₁₇ (SEQ ID NO:210), где X₁ включает A, D, E, K, N, Q, S или T, X₂ включает A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или Y, X₃ включает I, L, W или Y, X₄ включает F, T, W или Y, X₅ включает F, H или Y, X₆ включает H или Y, X₇ включает D или E, X₈ включает A, S или V, X₉ включает D, E, H, K, N, Q или Y, X₁₀ включает F, H или Y, X₁₂ включает H или Y, X₁₃ включает F или W, X₁₄ включает D, I, L, W или Y, X₁₆ включает D или Q, и X₁₇ включает E, F, H, I, L, M, N, P, W или Y; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность X₁ASX₄X₅X₆X₇X₈X₉LX₁₁ (SEQ ID NO:211), где X₁ включает F или R, X₄ включает E, K или N, X₅ включает A или G, X₆ включает I, L или V, X₇ включает A, D, G, L, P, Q, S, V или Y, X₈ включает K, Q, N, S или Y, X₉ включает A, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, S или T, и X₁₁ включает A, G или S; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AX₂X₃X₄X₅X₆X₇ (SEQ ID NO:212), где X₂ включает A, D, L, Q, S, T, V или Y, X₃ включает D, E, K, N, Q или S, X₄ включает H, I, K, L, M, N или V; X₅ включает H или L, X₆ включает H, I, L или M, и X₇ включает D, E, N, S или T; (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QQX₃X₄X₅X₆X₇X₈T (SEQ ID NO:213), где X₃ включает G или Y, X₄ включает D, F, G, H, K, L, R, S, T, V, W или Y, X₅ включает E, K, Q, R или S, X₆ включает I, F, T или W, X₇ включает E или P, и X₈ включает L, M или W.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF, содержит: VH-CDR1 содержит GLSLTSX₇SMX₁₀ (SEQ ID NO:214), где X₇ включает A, D или N, и X₁₀ включает S или V; VH-CDR2 содержит X₁X₂SNX₅GT (SEQ ID NO:215), где X₁ включает I или L, X₂ включает W или Y, и X₅ включает G или R; VH-CDR3 содержит ASIYYX₇AX₉YLHWYFDX₁₂ (SEQ ID NO:216), где X₇ включает D или E, X₉ включает D или E, и X₁₂ включает E или F; VL-CDR1 содержит RASX₄GIX₇X₈NLS (SEQ ID NO:217), где X₄ включает E или K, X₇ включает A, Q или S, X₈ включает K или N; VL-CDR2 содержит AX₂X₃X₄LHS (SEQ ID NO:218), где X₂ включает Q или T, X₃ включает D или S, и X₄ включает I, N или V; и VL-CDR3 содержит QQGX₄KWPLT (SEQ ID NO:219), где X₄

включает F, W или Y.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит одну или более (т.е. одну, две, три, четыре, пять или все шесть) CDR фелинизированного антитела 101, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит одну или более (т.е. одну, две, три, четыре, пять или все шесть) CDR фелинизированного антитела с созревшей аффинностью, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR одного или более фелинизированных антител 101 и вариантов с созревшей аффинностью, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR V_H , представленные на фиг. 17A. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR V_L , представленные на фиг. 17B. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR V_H домена V_H антитела, представленные на фиг. 17A. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит CDR V_L домена V_L антитела, представленный на фиг. 17B.

Согласно изобретению, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF содержит аминокислоту варианта фелинизированного антитела 101, описанного в настоящем документе, например, одну или более из следующих аминокислот в V_H : S28H, T30N, T30R, S31H, S35V, Y52W, S53P, G55R, G55Y, Y58D, T60D, T60E, T60H, T60S, S62D, K64D, K64E, S97H, S97K, S97M, S97N, S97Q, S97T, Y99F, Y101H, D104E, D104K, D104N, D104Q, F112E, D112H, F112N, F112P; и/или в V_L : R24F, S30A, S30L, S30P, S30Q, S30V, S30Y, N31Q, S34A, S34G, N53H, N53I, N53K, N53L, N53M, N53V, L54H, H55I, H55L, H55M, S56D, S56E, S56N, S56T. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF не содержит один или более из перечисленных выше вариантов аминокислот. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF не содержит аргинин G55R. Аминокислотные положения указаны остатком и номером в фелинизированном антителе 101, например, S28H обозначает H в положении, соответствующем S28 V_H или антитела 101. Вышеупомянутые положения включают CDR и каркасные аминокислотные остатки.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к NGF, содержит одну или более из следующих аминокислот в V_H : S35V, G55R, S97Q, F112E; и/или в V_L : S30A, S30Q, N53I, N53V. Пары цепей V_H и V_L , содержащие описанный выше вариант последовательности, демонстрируют совместимость мутаций V_H и V_L и взаимозаменяемость доменов V_H и V_L , содержащих мутации.

В некоторых вариантах осуществления связывающие белки содержат антитело

животных семейства собачьих или канинизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки содержат антитело животных семейства кошачьих или фелинизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток мутирован в такой, который позволяет сохранить свойства боковой цепи аминокислоты. Примеры свойств боковых цепей аминокислот включают: гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), гидрофильные аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) и аминокислоты, содержащие следующие боковые цепи: алифатические боковые цепи (G, A, V, L, I, P); боковые цепи, содержащие гидроксильные группы (S, T, Y); боковые цепи, содержащие атом серы (C, M); боковые цепи, содержащие карбоновую кислоту и амид (D, N, E, Q); боковые цепи, содержащие основания (R, K, H); и боковые цепи, содержащие ароматические соединения (H, F, Y, W). Буквы в скобках обозначают однобуквенные коды аминокислот. Аминокислотные замены внутри каждой группы называются консервативными заменами. Хорошо известно, что полипептид, содержащий модифицированную аминокислотную последовательность, в которой удален, добавлен и/или заменен один или более аминокислотных остатков, может сохранять исходную биологическую активность (Mark D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:5662-5666 (1984); Zoller M. J. and Smith M., Nucleic Acids Res. 10: 6487-6500 (1982); Wang A. et al., Science 224: 1431-1433; Dalbadie-McFarland G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 6409-6413 (1982)). Количество мутированных аминокислот не ограничено, но, как правило, их количество находится в пределах 40% аминокислот каждого CDR, предпочтительно - в пределах 35%, а еще более предпочтительно - в пределах 30% (например, в пределах 25%). Идентичность аминокислотных последовательностей можно определить, как описано в настоящем документе.

Изобретение обеспечивает рекомбинантные антитела, сконструированные или модифицированные для минимизации антигенности у животных семейства собачьих и кошачьих. В некоторых вариантах осуществления антитела дополнительно модифицируют для удаления эпитопов Т-клеток.

В настоящем документе термин «животное семейства собачьих» включает всех домашних собак, *Canis lupus familiaris* или *Canis familiaris*, если не указано иное.

Используемый в данном документе термин «животное семейства кошачьих» относится к любому члену семейства *Felidae*. Домашние кошки, чистокровные и/или беспородные кошки-компаньоны, а также дикие или одичавшие кошки – все они относятся к животным семейства кошачьих.

Используемый в данном документе термин «каркас животных семейства собачьих»

или «каркас животных семейства кошачьих» относится к аминокислотной последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела животных семейства собачьих, отличной от остатков гипервариабельной области, определенных в данном документе как остатки CDR. Что касается канинизированного антитела, в некоторых вариантах осуществления CDR животных семейства собачьих идентифицируют в последовательностях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антител животных семейства собачьих, которые близко соответствуют CDR NGF-связывающих антител, происходящих от других видов. В некоторых вариантах осуществления нативные CDR животных семейства собачьих заменены соответствующими чужеродными CDR (например, CDR из антител крысы или мыши) в обеих цепях. Что касается фелинизированного антитела, в некоторых вариантах осуществления CDR животных семейства кошачьих идентифицируют в последовательностях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антител животных семейства кошачьих, которые близко соответствуют CDR NGF-связывающих антител, происходящих от других видов. В некоторых вариантах осуществления нативные CDR животных семейства кошачьих заменены соответствующими чужеродными CDR (например, CDR из антител крысы или мыши) в обеих цепях. Необязательно, тяжелые и/или легкие цепи канинизированного или фелинизированного антитела могут содержать некоторые мутированные или чужеродные остатки, не относящиеся к CDR, например, каркасные аминокислотные остатки, которые варьируются в зависимости от последовательности антитела зародышевой линии, или мутации, которые сохраняют конформацию чужеродных CDR внутри антитела.

У собак присутствуют пять основных изоформ (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE) и две формы легкой цепи (κ и λ). У собак существует четыре подтипа IgG: IgGA, IgGB, IgGC и IgGD (Bergeron et al, 2014, *Comparative functional characterization of canine IgG subclasses*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 157:31-41). У кошек существует три подтипа IgG: IgG1a, IgG1b и IgG2 (Streitzel et al. 2014, *In vitro functional characterization of feline IgGs*. Vet Immunol Immunopathol 158, 214–223, doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.01.012).

Изобретение обеспечивает канинизированные и фелинизированные антитела, сконструированные для модуляции одной или более эффекторных функций или периода полувыведения из кровотока. Шарнирный и константный домены антитела взаимодействуют с рецепторами хозяина или белком комплемента, опосредуя эффекторные функции и регулируя антитела в кровотоке. В некоторых вариантах осуществления усиливается одна или более эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления одна или более эффекторных функций снижены или устранены.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению содержат модификации для модуляции антителозависимой цитотоксичности (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Неограничивающий пример включает в себя конструирование остатков константной области IgGB животных семейства собачьих Met242 и/или Leu243 для снижения эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления константная область IgGB по изобретению содержит замену M242A и L243A. В некоторых вариантах осуществления второй константный домен (CH2) и/или третий константный домен (CH3) содержат мутации и комбинации мутаций дикого типа, предназначенные для модуляции связывания с рецептором FcRn (неонатальный Fc). В константных областях животных семейства собачьих такие мутации включают, помимо прочего, замены Ala426, например A426Y или A426H, замены Thr286, например T286L или T286Y, замены Tyr436, например Y436H, и комбинации таких мутаций, включая, помимо прочего, A426Y + T286L, A426Y + Y436H, A426H + T286L и A426H + T286Y. В некоторых вариантах осуществления химерное или канинизированное антитело по изобретению содержит замену аминокислоты Asn434, такую как, помимо прочего, N434H. В константных областях животных семейства кошачьих такие мутации включают, помимо прочего, замены Ser428, включая, помимо прочего, S428Y или S428L, замены Gln311, включая, помимо прочего, Q311V, замены Leu309, включая, помимо прочего, L309V, замены Thr286, включая, помимо прочего, T286E, замены Glu380, включая, помимо прочего, E380T, и комбинации таких мутаций, включая, помимо прочего, S428Y + Q311V, S428Y + L309V, S428Y + Q311V + T286E, S428Y + Q311V + E380T и S428Y + L309V + E380T. В некоторых вариантах осуществления химерное или фелинизированное антитело по изобретению содержит замену аминокислоты Ser428 и/или Ser434, включая, помимо прочего, S428L и/или S434H.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемый в данном документе термин «специфически связывается» или «связывается специфически» означает, что NGF-связывающий белок по настоящему изобретению реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с NGF, чем с альтернативными антигенами. Например, NGF-связывающий белок связывается с NGF с существенно большей аффинностью

(например, по меньшей мере в 2 раза, или в 5 раз, или в 10 раз, или в 20 раз, или в 50 раз, или в 100 раз, или в 500 раз, или в 1000 раз, или в 10 000 раз или более), чем с другими белками или пептидами. В некоторых вариантах осуществления NGF-связывающие белки связываются с NGF с равновесной константой диссоциации K_D для эпитопа или мишени, с которой он связывается, например, 10^{-4} М или менее, например, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое специфически связывается с мишенью (например, NGF) одного вида, может также специфически связываться с ортологами NGF.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляции 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 нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную 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 трансплантированными CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акул, также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», используемое в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и обычно будет содержать

по меньшей мере одну CDR, которая смежная с одной или более каркасными последовательностями 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 . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

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 внутри антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, 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, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо 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 более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерных доменов V_H или V_L (например, дисульфидной связи(-ями)).

Термин «диантитело (Db)» относится к фрагменту двухвалентного антитела, сконструированному путем слияния генов (например, P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), EP 404097, WO 93/11161). В общем, диантитело представляет собой димер двух полипептидных цепей. В каждой из полипептидных цепей переменная область легкой цепи (V_L) и переменная область тяжелой цепи (V_H) в идентичной цепи соединены посредством короткого линкера, например, линкера из около пяти остатков, так что они не могут быть связаны вместе. Поскольку линкер между ними слишком короткий, V_L и V_H в одной и той же полипептидной цепи не могут образовывать фрагмент V-области одной цепи, а вместо этого образуют димер. Таким образом, диантитело имеет

два антигенсвязывающих домена. Когда области V_L и V_H к двух типов антигенов (a и b) объединяются с образованием $V_{La}-V_{Hb}$ и $V_{Lb}-V_{Ha}$ через линкер из около пяти остатков, а затем совместно экспрессируются, они секретируются как биспецифические Db. Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой такие Db.

Одноцепочечные антитела (также называемые «scFv») можно получить путем связывания V-области тяжелой цепи и V-области легкой цепи антитела (для обзора scFv см. Pluckthun «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies» Vol. 113, eds. Rosenberg and Moore, Springer Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994)). Способы получения одноцепочечных антител известны в данной области техники (см., например, патенты США № 4946778; 5260203; 5091513 и 5455030). В таких scFv V-область тяжелой цепи и V-область легкой цепи связаны друг с другом посредством линкера, предпочтительно полипептидного линкера (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 5879-5883). V-область тяжелой цепи и V-область легкой цепи в scFv могут происходить из одного и того же антитела или из разных антител. Пептидный линкер, используемый для лигирования V-областей, может представлять собой любой одноцепочечный пептид, состоящий из 12-19 остатков. ДНК, кодирующая scFv, может быть амплифицирована с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы либо всей ДНК, либо частичной ДНК, кодирующей желаемую аминокислотную последовательность, выбранную из ДНК, кодирующей тяжелую цепь или V-область тяжелой цепи вышеуказанного антитела, и ДНК, кодирующей легкую цепь или V-область легкой цепи вышеуказанного антитела; и использование пары праймеров, которая определяет два конца. Дальнейшую амплификацию можно впоследствии провести с использованием комбинации ДНК, кодирующей часть пептидного линкера, и пары праймеров, которая определяет оба конца ДНК, подлежащей лигированию с тяжелой и легкой цепью, соответственно. После конструирования ДНК, кодирующей scFv, можно использовать обычные методы для получения векторов экспрессии, содержащих эти ДНК, и хозяев, трансформированных этими векторами экспрессии. Кроме того, scFv можно получить обычными методами с использованием полученных хозяев. Эти фрагменты антител можно получить в организме хозяина путем получения генов, кодирующих фрагменты антител, и их экспрессии, как описано выше. Антитела, связанные с различными типами молекул, такими как полиэтиленгликоли (ПЭГ), могут использоваться в качестве модифицированных антител. Способы модификации антител уже известны в данной области техники. Термин «антитело» в настоящем изобретении также охватывает описанные выше антитела.

Термин «Kd», используемый в данном документе, относится к константе диссоциации взаимодействия антитело-антиген. Константа диссоциации, Kd, и константа

ассоциации, K_a , являются количественными показателями аффинности. При равновесии свободный антиген (Ag) и свободное антитело (Ab) находятся в равновесии с комплексом антиген-антитело (Ag-Ab), а константы скорости, k_a и k_d , количественно определяют скорости отдельных реакций. При равновесии, $k_a [Ab][Ag] = k_d [Ag-Ab]$. Константа диссоциации K_d определяется выражением: $K_d = k_d/k_a = [Ag][Ab]/[Ag-Ab]$. K_d имеет единицы концентрации, чаще всего М, mM, nM, pM и т.д. При сравнении аффинности антител, выраженной как K_d , большая аффинность к NGF обозначается меньшим значением. Константа ассоциации K_a определяется выражением: $K_a = k_a/k_d = [Ag-Ab]/[Ag][Ab]$. K_a имеет единицы обратной концентрации, чаще всего M^{-1} , mM^{-1} , nM^{-1} , pM^{-1} , и т.д. Используемый в данном документе термин «авидность» относится к силе связывания антиген-антитело с учетом валентности.

Полученные антитела можно очистить до гомогенности. Антитела можно выделить и очистить методом, обычно используемым для выделения и очистки белков. Антитела могут быть выделены и очищены с помощью комбинированного использования одного или более методов, соответственно выбранных из колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, диализа, препаративного электрофореза в полиакриламидном геле и изоэлектрофокусирования, например (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Такие методы не ограничиваются перечисленными выше. Хроматографические методы включают аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, хроматографию с обращенной фазой и адсорбционную хроматографию. Эти хроматографические методы можно применять на практике с использованием жидкофазной хроматографии, такой как ВЭЖХ и FPLC. Колонки, используемые в аффинной хроматографии, включают колонки с белком А и колонки с белком G. Например, колонки с белком А включают Hyper D, POROS и Sepharose FF (Pharmacia). Антитела также можно очистить, используя связывание антигена с использованием носителей, на которых иммобилизованы антигены.

Используемый в данном документе термин «терапевтический агент» относится к любому агенту или материалу, который оказывает благоприятное воздействие на реципиента-млекопитающего. Таким образом, «терапевтический агент» охватывает как терапевтические, так и профилактические молекулы, имеющие компоненты нуклеиновой кислоты или белка.

«Лечение» в настоящем документе относится к облегчению по меньшей мере

одного симптома, излечению и/или предотвращению развития данного заболевания или состояния.

Белки к NGF, описанные в настоящем документе, включая антитела или их фрагменты, полезны для облегчения или уменьшения симптомов, лечения или предотвращения заболеваний и расстройств, связанных с NGF. Белки или фрагменты к NGF, а также комбинации с другим агентом следует вводить в терапевтически эффективном количестве субъектам, нуждающимся в лечении заболеваний и расстройств, связанных с NGF, в форме фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает облегчение или уменьшение симптомов, лечение или предотвращение боли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления белки, антитела или их фрагменты к NGF ингибируют ассоциацию NGF с TrkA и/или p75, например, вводят отдельно или в сочетании со вторым агентом и используют для лечения, облегчения и уменьшения симптомов или предотвращения воспалительной боли, боли после операционного разреза, комплексной боли при раке (включая, помимо прочего, первичную или метастатическую боль при раке кости), боли при переломе, боли при остеопорозном переломе, боли при остеопорозе, боли в результате ожога и другой ноциептической боли.

В некоторых вариантах осуществления композиции антител и способы используют для облегчения или уменьшения симптомов, лечения или предотвращения боли при остеоартрите (ОА). ОА — это медленно прогрессирующее дегенеративное заболевание суставов, характеризующееся структурными изменениями всего сустава, включая суставной хрящ, синовиальную оболочку, субхондральную кость и околоуставные компоненты, что приводит к боли и потере функции сустава. Хроническая боль и ОА часто встречаются у собак и кошек. 20-30% собак поражены с клиническими проявлениями и имеют признаки ОА. До 40% всех кошек поражены с клиническими проявлениями, при этом 90% всех кошек старше 12 лет имеют признаки ОА.

У собак наиболее распространенной локализацией ОА является бедро, затем коленный сустав (колени), плечо и запястье. У кошек чаще всего поражены бедро, коленный сустав, запястье или позвоночник.

Белки, антитела или фрагменты антител к NGF необязательно вводят в комбинации с одним или более активными агентами, включая другие анальгетические агенты. Такие активные агенты включают анальгетические, антигистаминные, жаропонижающие, противовоспалительные, антибиотические, противовирусные и антицитокинные агенты. Активные агенты включают агонисты, антагонисты и модуляторы TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6,

IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- α , IFN- γ , BAFF, CXCL13, IP-10, VEGF, EPO, EGF, HRG, фактор роста гепатоцитов (HGF), гепсидин, включая антитела, реактивные в отношении любого из вышеперечисленных, и антитела, реактивные в отношении любого из их рецепторов. Активные агенты также включают, без ограничения, 2-арилпропионовые кислоты, ацеклофенак, ацетметацин, ацетилсалициловую кислоту (аспирин), алклофенак, альминопрофен, амоксиприн, ампирон, арилалкановые кислоты, азапропазон, бенорилат/бенорилат, беноксапрофен, бромфенак, карпрофен, целекоксиб, салицилат холина магния, клофезон, ингибиторы COX-2, дексибупрофен, декскетопрофен, диклофенак, дифлунизал, дроксикам, этензамид, этодолак, эторикоксиб, фаисламин, фенаминовую кислоту, фенбуфен, фенопрофен, флуфенаминовую кислоту, флуноксапрофен, флурбипрофен, ибупрофен, ибупроксам, индометацин, индопрофен, кебузон, кетопрофен, кеторолак, ломоксикам, локсопрофен, люмиракоксиб, салицилат магния, меклофенаминовую кислоту, мефенаминовую кислоту, мелоксикам, метамизол, метилсалицилат, мофебутазон, набуметон, напроксен, н-арилантраниловые кислоты, фактор роста нервов (NGF), оксаметацин, оксапрозин, оксикамы, оксифенбутазон, парекоксиб, феназон, фенилбутазон, фенилбутазон, пироксикам, пирпрофен, профенс, проглуметацин, производные пиразолидина, рофекоксиб, салицилсалицилат, салициламид, салицилаты, сульфинпиразон, сулиндак, супрофен, теноксикам, тиапрофеновую кислоту, толфенаминовую кислоту, толметин и валдекоксиб.

Антигистаминным может быть любое соединение, которое препятствует действию гистамина или его высвобождению из клеток (например, тучных клеток). Антигистаминные включают, помимо прочего, акривастин, астемизол, азатадин, азеластин, бетатастин, бромфенирамин, буклизин, цетиризин, аналоги цетиризина, хлорфенирамин, клемастин, CS 560, ципрогептадин, дезлоратадин, дексхлорфенирамин, эбастин, эпинастин, фексофенадин, CP 609, гидроксизин, левокабастин, лоратидин, метскополамин, мизоластин, норастемизол, фениндамин, прометазин, пириламин, терфенадин и траниласт.

Антибиотики включают, помимо прочего, амикацин, аминогликозиды, амоксициллин, ампициллин, ансамицины, арфенамин, азитромицин, азлоциллин, азтреонам, бацитрацин, карбацефем, карбапенемы, карбенициллин, цефаклор, цефадроксил, цефалексин, цефалотин, цефалотин, цефамандол, цефдинир, цефдиторен, цефепим, цефиксим, цефоперазон, цефотаксим, цефокситин, цефподоксим, цефпрозил, цефтазидим, цефтибутен, цефтизоксим, цефтобипрол, цефтриаксон, цефуроксим, цефалоспорины, хлорамфеникол, циластатин, ципрофлоксацин, кларитромицин, клиндамицин, клоксациллин, колистин, ко-тримоксазол, далфопристин, демеклоциклин,

клоксациллин, диритромицин, дорипенем, доксициклин, эноксацин, эртапенем, эритромицин, этамбутол, флуклоксациллин, фосфомицин, фуразолидон, фузидовую кислоту, гатифлоксацин, гелданамицин, гентамицин, гликопептиды, гербимицин, имипенем, изониазид, канамицин, левофлоксацин, линкомицин, линезолид, ломефлоксацин, лоракарбеф, макролиды, мафенид, меропенем, метициллин, метронидазол, мезлоциллин, миноциклин, монобактамы, моксифлоксацин, мупироцин, нафциллин, неомицин, нетилмицин, нитрофурантоин, норфлоксацин, офлоксацин, оксациллин, окситетрациклин, паромомицин, пенициллин, пенициллины, пиперациллин, платензимицин, полимиксин В, полипептиды, пронтозил, пиразинамид, хинупристин, рифампицин, рифампин, рокситромицин, спектиномицин, стрептомицин, сульфацетамид, сульфаметизол, сульфанилиимид, сульфасалазин, сульфизоксазол, сульфонамиды, тейкопланин, телитромицин, тетрациклин, тетрациклины, тикарциллин, тинидазол, тобрамицин, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол, омицин, тровафлоксацин и ванкомицин.

Активные агенты также включают альдостерон, беклометазон, бетаметазон, кортикостероиды, кортизол, ацетат кортизона, ацетат дезоксикортикостерона, дексаметазон, ацетат флудрокортизона, глюкокортикоиды, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизолон, стероиды и триамцинолон. Также рассматривается любая подходящая комбинация этих активных агентов.

Наиболее распространенной формой лечения ОА и боли, связанной с ОА, являются NSAID (которые также являются обезболивающими препаратами). NSAID не всегда достаточно эффективны, их обычно необходимо вводить ежедневно, и ни один из них не одобрен для длительного применения у кошек в США. Кроме того, существуют проблемы с безопасностью и переносимостью при применении NSAID как у собак, так и у кошек, особенно при длительном лечении. NSAID не рекомендуется применять одновременно с мАт антителами к NGF в течение длительного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления лечение включает одновременный прием пищевых добавок, содержащих жирные кислоты омега-3, микролактин и/или глюкозамин/хондроитин, в качестве помощи для здоровья суставов. Адекван (полисульфатированный гликозаминогликан) представляет собой одобренный FDA препарат, модифицирующий заболевание, который ингибирует потерю хряща и может также вводиться совместно.

Составы и способы введения

Для применения *in vivo* терапевтический агент, описанный в настоящем документе, обычно включают в фармацевтическую композицию перед введением. В таких

композициях одно или более терапевтических соединений, описанных в настоящем документе, присутствуют в качестве активного ингредиента(ов) (т.е. присутствуют в количествах, достаточных для обеспечения статистически значимого эффекта на симптомы муковисцидоза, измеренного с использованием репрезентативного анализа). Фармацевтическая композиция содержит одно или более таких соединений в комбинации с любым фармацевтически приемлемым носителем(ями), которые, как известно специалистам в данной области техники, подходят для конкретного способа введения. Кроме того, в композиции могут, но не обязательно, присутствовать другие фармацевтически активные ингредиенты (включая другие терапевтические агенты).

Антитела по настоящему изобретению могут быть составлены в соответствии со стандартными методами (см., например, Remington's Pharmaceutical Science, последнее издание, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A) и могут содержать фармацевтически приемлемые носители и/или добавки. Настоящее изобретение относится к композициям (включая реагенты и фармацевтические препараты), содержащим антитела по изобретению и фармацевтически приемлемые носители и/или добавки. Примеры носителей включают поверхностно-активные вещества (например, ПЭГ и Tween), эксципиенты, антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту), красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы, буферные агенты (например, фосфорную кислоту, лимонную кислоту и другие органические кислоты), хелатирующие агенты (например, ЭДТА), суспендирующие агенты, изотонизирующие агенты, связующие вещества, дезинтеграторы, лубриканты, усилители текучести и корректирующие вещества. Однако носители, которые могут использоваться в настоящем изобретении, не ограничиваются этим списком. Фактически, можно использовать и другие обычно используемые носители: легкая безводная кремниевая кислота, лактоза, кристаллическая целлюлоза, маннит, крахмал, кальций-кармелоза, натрий-кармелоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилацетальдиэтиламиноацетат, поливинилпирролидон, желатин, триглицерид среднецепочечной жирной кислоты, полиоксиэтиленгидрогенизированное касторовое масло 60, сахароза, карбоксиметилцеллюлоза, кукурузный крахмал, неорганическая соль и так далее. Композиция также может содержать другие низкомолекулярные полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулин, и аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин и лизин. Когда композицию готовят в виде водного раствора для инъекции, она может содержать изотонический раствор, содержащий, например, физиологический раствор, декстрозу и другие адьюванты, включая, например, D-сорбит, D-маннозу, D-маннит и хлорид натрия, который также

может содержать соответствующий солюбилизирующий агент, например, спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль и ПЭГ) и неионогенный детергент (полисорбат 80 и HCO-50).

При необходимости антитела по настоящему изобретению могут быть инкапсулированы в микрокапсулы (микрокапсулы, изготовленные из гидроксицеллюлозы, желатина, полиметилметакрилата и т.п.) и превращены в компоненты коллоидных систем доставки лекарств (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) (например, см. «Remington's Pharmaceutical Science, 16th edition», Oslo Ed. (1980)). Более того, известны способы получения лекарственных препаратов с пролонгированным высвобождением, и их можно применять для антител по настоящему изобретению (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 (1982); патент США № 3773919; заявка на патент EP № 58481; Sidman et al., *Biopolymers* 22: 547-556 (1983); EP: 133988).

Предпочтительным путем введения как животным семейства собачьих, так и кошачьих является подкожная инъекция, обычно в кожу у основания шеи. В некоторых вариантах осуществления белок к NGF упакован в интегрированную систему доставки, такую как ручка или предварительно заполненный шприц для подкожного введения. Ghil et al. описывают введение биоаналога адалимумаба, SB5, с помощью предварительно заполненного шприца (PFS, англ.: prefilled syringe) и шприца-ручки (AI, англ.: autoinjector) с учетом боли в месте инъекции, предпочтений пациента и безопасности при ревматоидном артрите (РА) (см. Ghil et al., *Usability and safety of SB5 (an adalimumab biosimilar) prefilled syringe and autoinjector in patients with rheumatoid arthritis. Curr Med Res Opin* 2019 Mar;35(3):497-502.) Композиции по изобретению аналогичным образом вводят животным семейства собачьих, кошачьих и другим млекопитающим.

Термин «терапевтически эффективное количество» применительно к лечению болезненного состояния относится к количеству соединения либо отдельного, либо содержащегося в фармацевтической композиции, которое способно оказывать любой обнаруживаемый положительный эффект на любой симптом, аспект, или характеристики болезненного состояния при введении в виде однократной дозы или в виде многократных доз. Чтобы быть полезным, такой эффект не обязательно должен быть абсолютным.

Термины «лечить», «процесс лечения» и «лечение», используемые в настоящем документе, включают введение соединения до появления клинических симптомов болезненного состояния, чтобы предотвратить любой симптом, а также введение соединения после появления клинические симптомы болезненного состояния с целью уменьшения или устранения любого симптома, аспекта или характеристики болезненного

состояния. Такое лечение не обязательно должно быть абсолютным, чтобы быть полезным.

В определенных вариантах осуществления, терапевтический агент по данному изобретению можно вводить системно, например, перорально, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как инертный разбавитель или усваиваемый пищевой носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, могут быть спрессованы в таблетки или могут быть включены непосредственно с пищей, входящей в рацион пациента. Для перорального терапевтического введения активное соединение можно комбинировать с одним или более эксципиентами и применять в виде проглатываемых таблеток, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и тому подобного. Такие композиции и препараты должны содержать не менее 0,1% активного соединения. Процентное содержание композиций и препаратов может, конечно, варьироваться и обычно может составлять от около 2 до около 60% от массы данной стандартной лекарственной формы. Количество активного соединения в таких терапевтически полезных композициях таково, что будет получен эффективный уровень дозировки.

Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и тому подобное также могут содержать следующее: связующие, такие как трагакантовая камедь, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; эксципиенты, такие как фосфат дикальция; дезинтегрирующее средство, такое как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и тому подобное; смазывающее вещество, такое как стеарат магния; и может быть добавлен подслащающий агент, такой как сахароза, фруктоза, лактоза или аспартам, или ароматизатор, такой как перечная мята, винтергреновое масло или вишневый ароматизатор. Когда единичная дозированная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как растительное масло или полиэтиленгликоль. Разнообразные другие материалы могут присутствовать в виде покрытий или могут иным образом модифицировать физическую форму твердой единичной дозированной формы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты желатином, воском, шеллаком или сахаром и тому подобным. Сироп или эликсир может содержать активное соединение, сахарозу или фруктозу в качестве подслащающего агента, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Конечно, любой материал, используемый при приготовлении любой единичной дозированной формы, должен быть фармацевтически приемлемым и по существу нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, активное соединение

может быть включено в препараты и устройства с замедленным высвобождением.

Активное соединение также можно вводить внутривенно или внутривнутрибрюшинно путем инфузии или инъекции. Растворы активного соединения или его солей могут быть приготовлены в воде, необязательно смешанной с нетоксичным поверхностно-активным веществом. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, триацетине и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант, предотвращающий рост микроорганизмов.

Фармацевтические лекарственные формы, подходящие для инъекций или инфузий, могут включать стерильные водные растворы или дисперсии, или стерильные порошки, содержащие активный ингредиент, которые приспособлены для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных или инфузионных растворов или дисперсий, необязательно инкапсулированных в липосомы. Во всех случаях конечная лекарственная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях производства и хранения. Жидкий носитель или несущая среда могут быть растворителем или жидкой дисперсионной средой, включающей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкие полиэтиленгликоли и тому подобное), растительные масла, нетоксичные глицеридовые сложные эфиры и их подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем образования липосом, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий или с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов можно достигать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например сахара, буферы или хлорид натрия. Длительное всасывание композиций, вводимых путем инъекции, может быть достигнуто путем использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и методики лиофилизации, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый компонент, присутствующий в заранее стерильно отфильтрованных растворах.

Подходящие дозировки соединений по данному изобретению, по могут определять путем сравнения их активности *in vitro* и активности *in vivo* на моделях на животных. В некоторых вариантах осуществления полезная доза составляет от около 0,1 мг/кг до около 5 мг/кг или от около 0,5 мг/кг до около 2 мг/кг. Способы экстраполяции эффективных доз для людей и животных различного размера известны в данной области техники; например, см. пат. США № 4938949.

Количество соединения или его активной соли или производного, необходимое для использования в лечении, будет варьироваться не только в зависимости от конкретной выбранной соли, но также от пути введения, природы подлежащего лечению состояния, а также возраста и состояния пациента, и в конечном итоге остается на усмотрение лечащего врача или лечащего персонала.

Однако в целом подходящая доза будет находиться в диапазоне от около 0,5 до около 100 мг/кг, например, от около 10 до около 75 мг/кг массы тела в день, например от 3 до около 50 мг на килограмм масса тела реципиента в день, предпочтительно в диапазоне от 6 до 90 мг/кг/день, наиболее предпочтительно в диапазоне от 15 до 60 мг/кг/день.

Соединение удобно вводить в виде единичной дозированной формы; например, содержащей от 5 до 1000 мг, эффективно от 10 до 750 мг, наиболее эффективно от 50 до 500 мг активного ингредиента на единичную дозированную форму.

В идеале активный ингредиент следует вводить для достижения пиковых концентраций активного соединения в плазме от около 0,5 до около 75 мкМ, предпочтительно от около 1 до 50 мкМ, наиболее предпочтительно от около 2 до около 30 мкМ. Этого можно достичь, например, путем внутривенной инъекции 0,05-5% раствора активного ингредиента, необязательно в физиологическом растворе, или перорального введения в виде болюса, содержащего около 1-100 мг активного ингредиента. Желательные уровни в крови можно поддерживать посредством непрерывной инфузии, обеспечивающей около 0,01-5,0 мг/кг/час, или с помощью периодических инфузий, содержащих около 0,4-15 мг/кг активного ингредиента(ов).

Желаемая доза может быть удобно представлена в виде однократной дозы или в виде разделенных доз, вводимых через соответствующие интервалы, например, в виде двух, трех, четырех или более частей доз в день. Часть дозы саму по себе можно дополнительно разделять, например, на несколько отдельных введений со свободно определяемыми интервалами.

Хотя настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что в нем могут быть сделаны различные изменения, замены и модификации, не отступая от сущности и объема изобретения, определенных в прилагаемой формуле

изобретения.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые даны только в иллюстративных целях и не предназначены для какого-либо ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1

Получение и характеристика крысиного антитела 2166, которое связывается с NGF животных семейства собачьих.

Крыс линии Lewis иммунизировали человеческим NGF (R&D Systems, 256-GF-100/CF) еженедельно в течение восьми недель. Титры измеряли методом проточной цитометрии с использованием гранул, покрытых человеческим NGF. Гранулы конъюгировали с человеческим NGF (R&D Systems, 256-GF-100/CF) и инкубировали с различными разведениями сыворотки (1:100, 1:500, 1:2500) в течение 30 минут. Гранулы промывали и определяли связывание с использованием флуоресцентно-меченного вторичного антитела к крысиному IgG. Флуоресценцию измеряли с помощью Intellicyt iQue Screener Plus. Титры измеряли при разведении 1:2500 для всех трех крыс, и они были в около 100 раз выше, чем значения нормальной сыворотки линии Lewis.

У крыс собирали лимфатические узлы (плечевые, подмышечные, паховые, подколенные и седалищные) и костный мозг из бедренной кости, большеберцовой кости и таза со значительными титрами NGF. Клетки из обеих тканей выделяли и обогащали плазматическими клетками с помощью проточной цитометрии. Обогащенную суспензию плазматических клеток вводили в микрофлюидные скрининговые устройства AbCellera с 91 000 или 153 000 отдельных реакционных камер объемом нанолитр. Отдельные клетки, секретирующие NGF-специфические антитела, идентифицировали и выделяли с помощью анализа на основе гранул. Гранулы, покрытые антителом к крысиному IgG, переносили на для микрофлюидные скрининговые устройства и инкубировали с отдельными клетками, секретирующими антитела. IgG, секретируемый плазматическими клетками, улавливали на гранулах с использованием константной области. Связывание с секретируемым IgG, иммобилизованным на гранулах, впоследствии оценивали с использованием флуоресцентно-меченного антигена NGF человека. Положительные совпадения были идентифицированы с помощью автоматического анализа видеоинформации и восстановлены с использованием автоматизированных протоколов на основе робототехники. Приблизительно 269 000 отдельных В-клеток были проверены в анализе NGF-связывания, и 592 клетки экспрессировали антитела, распознающие NGF. Из этих положительных клеток было идентифицировано 190 уникальных последовательностей

антител. Восемьдесят восемь антител были выбраны из 190 антител на основе разнообразия клонотипов.

С помощью одноклеточной полимеразной цепной реакции и специальных протоколов молекулярной биологии были созданы библиотеки секвенирования NGS (MiSeq, Illumina) с использованием автоматизированных рабочих станций (Bravo, Agilent). Данные секвенирования были проанализированы с использованием специального биоинформационного конвейера для получения парных последовательностей тяжелой и легкой цепи для каждой извлеченной клетки, секретирующей антитела (Jones et al., 2020, bioRxiv 2020.09.30.318972. doi: 10.1101/2020.09.30.318972). Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей крысиного антитела 2166 показаны на фиг. 1 и фиг. 2, соответственно, и указаны CDR. Варибельную область (V(D)J) каждой цепи антитела синтезировали и встраивали в экспрессирующие плазмиды млекопитающих с использованием специального автоматизированного высокопроизводительного конвейера клонирования.

Векторы экспрессии трансфицировали в клетки Expi293-F (Gibco, ThermoFisher Scientific) в планшетах с 24 глубокими лунками с использованием протокола, рекомендованного производителем. Через четыре дня после трансфекции кондиционированную среду очищали гранулами белка А и антитело элюировали добавлением 100 мМ глицина, pH 2,0, и нейтрализовали до pH 7,0 добавлением 1 М Tris-HCl, pH 8,0. В нейтрализованных антителах заменяли буфер на PBS, pH 7,2.

Анализ очищенных антител включал CE-SDS (денатурирующий капиллярный электрофорез додецилсульфата натрия) и DSF (дифференциальная сканирующая флуориметрия). CE-SDS использовали для определения чистоты очищенных антител и проводили с использованием прибора LabChip GXII Touch (Perkin Elmer). Два микролитра раствора антител в концентрации 350 мкг/мл в PBS смешивали с невозстанавливающим денатурирующим буферным раствором (Perkin Elmer) и инкубировали при 70°C в течение 10 минут. Разделение и обнаружение осуществляли с использованием настройки анализа HT Antibody Analysis 200 на приборе LabChip (Perkin Elmer). Данные флуоресценции анализировали с использованием программного обеспечения LabChip GX Reviewer (Perkin Elmer) с процентом чистоты. Процент чистоты крысиного моноклонального антитела 2166 составлял 96%.

Температуру плавления (T_m) антител оценивали с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) с использованием флуоресцентного зонда SYPRO™ Orange (5000-кратный концентрированный раствор, Thermo Fisher Scientific). 6 мкл раствора мАт в концентрации 350 мкг/мл в PBS смешивали с 6 мкл 19-кратно

концентрированного раствора SYPRO™ Orange, разбавленного в PBS. Термическое разворачивание, оцениваемое по изменению флуоресценции, измеряли на приборе Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) с использованием считывающей головки системы ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad Laboratories). Длины волн возбуждения и эмиссии составляли 450–490 нм и 560–580 нм, соответственно. Сигнал флуоресценции измеряли при начальной температуре 25°C и увеличивали до 95°C с шагом 0,5°C/мин. Данные анализировали и кривые плавления интегрировали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro (v1.1). T_m определяли как локальный минимум, взятый из производной кривой плавления. T_m крысиного антитела 2166 составляла 66,5°C.

Был завершен анализ связывания для подтверждения связывания антител с NGF (R&D Systems, 256-GF-100/CF). Кроме того, специфичность антител определяли путем тестирования связывания антител с NT-3 и BDNF, которые являются близкородственными белками. Было подтверждено, что уникальные последовательности антител связываются с мишенью скрининга с использованием мультиплексного анализа с гранулами на высокопроизводительном проточном цитометре. Различные оптически закодированные гранулы были конъюгированы с человеческим NGF (R&D Systems, 256-GF-100/CF), NT-3 (R&D Systems, 267-N3-025/CF) или BDNF (R&D Systems, 248-BDB-050/CF). Очищенные антитела инкубировали с мультиплексированными гранулами при различных концентрациях антител в течение 30 минут при комнатной температуре. Гранулы промывали и определяли связывание с использованием флуоресцентно-меченного вторичного антитела. Флуоресценцию измеряли с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии на планшете на Intellicyt® iQue Screener Plus.

Медианную интенсивность флуоресценции каждого антитела нормализовали по медианной интенсивности флуоресценции соответствующего изотипического контроля для отдельных типов гранул. Значения антител, превышающие изотипический контроль более чем в 10 раз, считались связывающими.

Антитело 2166, связанное с NGF, более чем в 59 раз превышает фоновый уровень, а связывание этого антитела с NT-3 и BDNF находилось на фоновом уровне.

Функциональный анализ с клетками TF-1 использовали для определения того, блокирует ли связывание антитела 2166 с NGF животных семейства собачьих способность NGF животных семейства собачьих индуцировать передачу сигнала с человеческим TrkA, который является рецептором с высокой аффинностью к NGF (Chevalier *et al.*, 1994. Blood, 83:1479). В этих исследованиях в качестве источника NGF использовали NGF животных семейства собачьих (Genbank NP_001181879.1). NGF животных семейства собачьих со

стрептококковой меткой (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) на С-конце стабильно экспрессировали в клетках Dmel-2 и очищали с помощью хроматографии StrepTactinXT с последующей стадией доочистки с помощью хроматография Superdex 200 16/600. Пролиферацию клеток TF-1 можно стимулировать различными факторами роста, такими как GM-CSF и NGF. Клетки TF-1 (ATCC-CRL2003) культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 нг/мл рекомбинантного человеческого GM-CSF. Клетки поддерживали в диапазоне от 3×10^4 до 5×10^5 жизнеспособных клеток/мл и пассировали каждые 48 часов. Каждое условие выполняли в трех повторностях лунок. Клетки собирали и подсчитывали. Клетки ресуспендировали в среде без GM-CSF при концентрации $1,75 \times 10^5$ клеток/мл и инкубировали в колбе во влажном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 часов. Во время инкубации смеси NGF/антитела готовили в средах в виде 2-кратных растворов сред в полной среде без GM-CSF и с 10 нг/мл NGF животных семейства собачьих. Антитела добавляли к соответствующим 2-кратным растворам сред и растворы NGF/антитела инкубировали в течение по меньшей мере 1 часа при комнатной температуре перед добавлением к клеткам. Затем клетки собирали и ресуспендировали в соответствующем объеме среды для получения суспензии $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде без GM-CSF. Добавляли по 50 мкл клеточной суспензии на лунку 96-луночного планшета, в которую добавляли по 50 мкл 2-кратной среды NGF/антитело на лунку клеточного планшета. Клетки инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 часов, затем в каждую лунку добавляли 20 мкл реагента Aqueous One solution (Promega). Клетки инкубировали еще 4 часа во влажном инкубаторе с температурой 37°C и 5% CO₂, а затем измеряли поглощение при 490 нм на приборе BioTek Synergy/ne O₂. Данные анализировали путем вычитания пустой лунки из всех измеренных значений. Процент ингибирования рассчитывали по следующей формуле: % ингибирования = $100 \times [1 - (X - \text{MIN}) / (\text{MAX} - \text{MIN})]$, где X = сигнал при заданной концентрации, MAX = 0% ингибирование = только NGF животных семейства собачьих и MIN = 100% ингибирование = контроль без NGF. Рассчитывали среднее значение трех повторностей для каждого условия. Данные о пролиферации крысиного антитела 2166 и изотипического контроля крысиного антитела показаны на фиг. 3. Данные демонстрируют, что крысиное антитело 2166 эффективно блокирует связывание NGF с TrkA.

Домен VH антитела 2166 был слит с константными доменами IgGB животных семейства собачьих (Tang *et al.* 2001. Vet. Immunol. Immunopathol. 80:259), а домен VL антитела 2166 был слит с константным доменом каппа животных семейства собачьих для получения химерного антитела животных семейства собачьих (фиг. 4). Изменения двух

остатков (AA) были сделаны в Fc (подчеркнуты и выделены жирным шрифтом) для устранения эффекторной активности, и эти изменения аналогичны мутации «LALA», описанной для Fc человеческого IgG1 (Tamm & Schmidt, 1997. *Int. Rev. Immunol.* 16:57). Эти две конструкции были субклонированы в pcDNA3.4 (ThermoFisher Scientific), совместно трансфицированы с системой Expi293 (ThermoFisher Scientific) и очищены с помощью хроматографии HiTrap Protein A HP. Чистота антитела, измеренная методом SDS/PAGE, составляла >95%, а по данным SEC (эксклюзионной хроматографии) антитело было на 98% мономерным.

Аффинность химерного антитела 2166 животных семейства собачьих к NGF животных семейства собачьих измеряли методом SPR (поверхностный плазмонный резонанс). Для этих исследований NGF животных семейства собачьих (Genbank NP_001181879.1) был создан путем слияния C-конца с Flag-меткой (DYKDDDDK), экспрессии конструкции NGF животных семейства собачьих с помощью бакуловирусной технологии и последующей очистки NGF с помощью аффинной хроматографии Anti-DYKDDDDK G1. Кинетику связывания химерного антитела 2166 животных семейства собачьих с NGF животных семейства собачьих измеряли с помощью прибора Biacore T200. Формат анализа заключался в захвате Fc антитела 2166 на сенсорном чипе с белком A и использовании NGF животных семейства собачьих в качестве аналита. Рабочий буфер представлял собой буфер HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% Tween-20), а температура прибора была установлена на уровне 25°C. Скорость потока составляла 40 мкл/мин, а пять концентраций аналита, протестированные в двух экземплярах, находились в диапазоне от 0,78 нМ до 12,5 нМ. Сигналы связывания корректировали для пустого образца, и полученную сенсограмму (фиг. 5) использовали для определения констант скорости (k_a и k_d) и аффинности связывания (K_D) с использованием модели связывания «один к одному» с программным обеспечением BIAEVAL. В этих условиях связывания, кинетика связывания химерного антитела 2166 животных семейства собачьих была следующей: k_a (1/М*с) = 1,2E+7, k_d (1/с) = 3,5E-6 и K_D = 3E-13. Измеренная аффинность (K_D) этого антитела превышает чувствительность прибора Biacore, но на основании этих данных она оценивается как минимум 50 пМ.

Способность химерного антитела 2166 животных семейства собачьих блокировать связывание NGF животных семейства собачьих с рецепторами NGF животных семейства собачьих (TrkA и p75) измеряли в анализе SPR на Biacore T200. Формат анализа заключался в захвате рецептора NGF на сенсорном чипе и пропуске либо только NGF животных семейства собачьих, либо NGF, смешанного с химерным антителом 2166 животных семейства собачьих, либо только химерного антитела 2166 животных семейства

собачьих.

Рецепторы NGF, используемые в анализе, состоят из внеклеточных доменов p75 животных семейства собачьих (XP_038340439.1) и TrkA животных семейства собачьих (XP_038398906.1), слитых с Fc человеческого IgG1 (UniProtKB P01857) с 2X линкером Gly-Gly-Gly-Ser между рецептор и Fc. Слитые белки экспрессировали в клетках CHO и очищали хроматографией с белком А. Для этого анализа белки p75-Fc и Trk-Fc были захвачены на сенсорном чипе с человеческим антителом к Fc.

Аналитами служили только NGF, только химерное антитело 2166 животных семейства собачьих и смесь химерного антитела 2166 и NGF животных семейства собачьих (в молярном соотношении 2:1). Семь концентраций NGF при условии «только NGF» находились в диапазоне от 0,78 нМ до 50 нМ. Концентрации NGF животных семейства собачьих в смеси химерного антитела 2166 и NGF животных семейства собачьих составляли 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ. Наконец, четыре концентрации одного химерного антитела 2166 и животных семейства собачьих находились в диапазоне от 12,5 нМ до 100 нМ. Температура прибора и скорость потока были установлены на уровне 25°C и 40 мкл/мин, соответственно.

Сигналы связывания корректировали для эталона, и полученные сенсограммы использовали для определения констант скорости (k_a и k_d) и аффинности связывания (K_D) с использованием модели связывания «один к одному» с программным обеспечением BIAEVAL. Сенсограммы (фиг. 5, 6, 7, 8) представляют условие «только NGF» и смесь химерного антитела 2166 и NGF животных семейства собачьих как для рецепторов p75-Fc, так и для TrkA-Fc. В этих условиях связывания, кинетика связывания только NGF животных семейства собачьих с p75 животных семейства собачьих в димерном формате была следующей: k_a (1/М*с) = 1,2E+10, k_d (1/с) = 45 и K_D = 3,7E-9 (фиг. 6). Кинетика связывания только NGF животных семейства собачьих с TrkA животных семейства собачьих в димерном формате была следующей: k_a (1/М*с) = 1,3E+7, k_d (1/с) = 1,7E-4 и K_D = 1,3E-11 (фиг. 7). Никакого связывания с рецепторами NGF животных семейства собачьих не наблюдалось в случае использования только химерного антитела 2166 животных семейства собачьих (данные не показаны). Как видно из сенсограмм (фиг. 8 и 9), химерное антитело 2166 животных семейства собачьих эффективно блокирует связывание NGF животных семейства собачьих с TrkA и p75 животных семейства собачьих.

Пример 2

Канинизация крысиного антитела 2166

База данных антител животных семейства собачьих была создана путем

проведения NGS (секвенирования нового поколения) на РВМС животных семейства собачьих (моноклеарных клетках периферической крови). Эта база данных содержит последовательности из $5,0 \times 10^6$ доменов VH, $3,7 \times 10^6$ доменов VK и $2,6 \times 10^6$ доменов VL. Последовательности HCDR 1, 2 и LCDR 1, 2, 3 из родительского антитела 2166 использовали в алгоритме для идентификации ближайших последовательностей CDR животных семейства собачьих и связанных с ними каркасных последовательностей в базе данных антител животных семейства собачьих. Эти связанные каркасные последовательности были включены в библиотеку фагового дисплея scFv вместе с наиболее близкими каркасными последовательностями зародышевой линии, а связанные каркасные последовательности с 1-3 остатками вернулись обратно к ближайшей зародышевой линии. Для идентификации набора последовательностей CDR, которые аналогичны CDR исходного 2166 и ближе по идентичности к зародышевой линии и экспрессируемым последовательностям CDR, использовали проприетарный алгоритм. Эти CDR и каркасные последовательности были использованы для создания библиотеки фагового дисплея антител scFv с теоретической вариабельностью 3×10^{12} . Фаговую селекцию антител завершали с использованием NGF животных семейства собачьих в течение четырех раундов, и с каждым раундом строгость повышалась за счет снижения концентрации антигена и увеличения количества промываний. В частности, 96-луночные планшеты были покрыты 200 пмоль NGF для первого раунда, 100 пмоль для второго раунда и 50 пмоль для третьего и четвертого раундов. Количество промываний с помощью PBS-Tween-20 (0,01%) после селекции составило шесть для первого раунда, семь для второго раунда, восемь для третьего раунда и девять для четвертого раунда. Выходные клоны scFv из третьего и четвертого раундов секвенировали, а уникальные клоны переформатировали в IgG и проверяли на связывание с NGF животных семейства собачьих с помощью SPR. Последовательности и кинетика связывания с NGF животных семейства собачьих из 69 лучших канинизированных клонов вместе с родительским клоном 2166 показаны на фиг. 1 и 2 и в таблице 2.

Таблица 2. Связывание с NGF животных семейства собачьих

Клон	ka	kd	KD
2166	2,38E+06	1,00E-05	4,20E-12
SC-42_006	2,22E+06	1,75E-04	7,88E-11
SC-42_007	1,32E+06	1,38E-04	1,05E-10
SC-42_008	1,96E+06	9,40E-05	4,79E-11
SC-42_010	2,06E+06	8,55E-05	4,16E-11
SC-42_011	1,27E+06	7,28E-05	5,75E-11
SC-42_023	4,19E+06	4,66E-04	1,11E-10
SC-42_024	3,63E+06	5,22E-04	1,44E-10
SC-42_025	3,90E+06	5,88E-04	1,51E-10
SC-42_026	4,26E+06	9,20E-04	2,16E-10

SC-42 027	3,43E+06	6,51E-04	1,90E-10
SC-42 028	3,19E+06	4,96E-04	1,56E-10
SC-42 029	4,09E+06	5,44E-04	1,33E-10
SC-42 030	4,10E+06	6,34E-04	1,55E-10
SC-42 031	4,23E+06	6,46E-04	1,53E-10
SC-42 032	4,61E+06	2,64E-04	5,73E-11
SC-42 033	3,73E+06	5,81E-04	1,56E-10
SC-42 034	2,81E+06	1,51E-03	5,39E-10
SC-42 035	3,02E+06	6,24E-04	2,06E-10
SC-42 036	3,40E+06	8,77E-04	2,58E-10
SC-42 037	3,25E+06	4,82E-04	1,49E-10
SC-42 038	3,21E+06	5,30E-04	1,65E-10
SC-42 040	4,82E+06	7,09E-04	1,47E-10
SC-42 041	3,42E+06	5,55E-04	1,62E-10
SC-42 042	3,51E+06	9,76E-04	2,78E-10
SC-42 043	2,79E+06	7,13E-04	2,55E-10
SC-42 044	3,12E+06	4,53E-04	1,45E-10
SC-42 045	3,34E+06	4,12E-04	1,23E-10
SC-42 046	3,45E+06	4,89E-04	1,42E-10
SC-42 047	3,55E+06	4,41E-04	1,24E-10
SC-42 048	4,25E+06	4,89E-04	1,15E-10
SC-42 049	3,80E+06	5,49E-04	1,44E-10
SC-42 050	3,49E+06	5,02E-04	1,44E-10
SC-42 051	3,27E+06	6,09E-04	1,86E-10
SC-42 052	3,35E+06	4,13E-04	1,23E-10
SC-42 053	3,41E+06	4,71E-04	1,38E-10
SC-42 054	3,32E+06	5,91E-04	1,78E-10
SC-42 055	4,23E+06	7,73E-04	1,83E-10
SC-42 057	3,73E+06	5,53E-04	1,48E-10
SC-42 058	3,31E+06	5,88E-04	1,78E-10
SC-42 059	3,20E+06	6,38E-04	2,00E-10
SC-42 060	3,87E+06	5,85E-04	1,51E-10
SC-42 061	3,16E+06	4,94E-04	1,56E-10
SC-42 062	3,27E+06	6,36E-04	1,95E-10
SC-42 063	3,57E+06	8,52E-04	2,39E-10
SC-42 064	2,43E+06	6,51E-04	2,68E-10
SC-42 065	3,47E+06	5,95E-04	1,71E-10
SC-42 066	3,16E+06	5,21E-04	1,65E-10
SC-42 067	3,57E+06	7,02E-04	1,97E-10
SC-42 068	3,59E+06	4,87E-04	1,36E-10
SC-42 069	2,39E+06	4,67E-04	1,96E-10
SC-42 070	4,70E+06	5,43E-04	1,15E-10
SC-42 071	1,45E+06	6,89E-04	4,74E-10
SC-42 072	3,98E+06	7,86E-04	1,98E-10
SC-42 073	5,83E+06	5,46E-04	9,37E-11
SC-42 075	4,54E+06	1,55E-03	3,42E-10
SC-42 077	3,35E+06	2,91E-04	8,71E-11
SC-42 079	3,53E+06	8,49E-04	2,40E-10
SC-42 080	3,31E+06	4,46E-04	1,35E-10
SC-42 081	3,41E+06	2,17E-03	6,35E-10
SC-42 082	3,45E+06	2,52E-04	7,29E-11
SC-42 083	4,17E+06	6,23E-04	1,49E-10
SC-42 084	3,60E+06	4,73E-04	1,32E-10
SC-42 085	4,28E+06	8,34E-04	1,95E-10
SC-42 088	3,39E+06	1,06E-03	3,11E-10

SC-42_089	4,26E+06	7,74E-04	1,82E-10
SC-42_090	1,91E+06	1,52E-04	7,99E-11
SC-42_091	1,00E+04	1,00E-04	1,00E-08
SC-42_101	3,41E+06	3,80E-04	1,11E-10
SC-42_102	2,91E+06	1,07E-03	3,67E-10

Сенсограммы для всех 69 клонов представлены на фиг. 10. SPR завершали связыванием антитела с амином (~5 мкг/мл) с сенсорным чипом HC30M путем активации EDC/NHS с последующим гашением этаноламином HCL. NGF животных семейства собачьих (Genbank NP_001181879.1), используемый в качестве аналита для анализов SPR, представлял собой тот же препарат, который описан в Примере 1 для NGF животных семейства собачьих, помеченного на C-конце Flag-меткой (DYKDDDDK).

Способность канинизированного антитела SC42_101 блокировать связывание NGF животных семейства собачьих с рецепторами NGF животных семейства собачьих (TrkA и p75) измеряли в анализе SPR на Biacore T200. Формат анализа заключался в захвате рецептора NGF на сенсорном чипе и пропуски либо только NGF животных семейства собачьих, либо NGF, смешанного с канинизированным антителом SC42_101, либо только канинизированного антитела SC42_101. Методы блокирования рецептора идентичны методам, описанным для химерного антитела 2166 животных семейства собачьих в Примере 1. Сенсограммы (фиг. 11, 12, 13, 14) представляют условие «только NGF» и смесь канинизированного антитела SC42_101-NGF как для p75-Fc, так и для TrkA-Fc. В этих условиях связывания, кинетика связывания только NGF животных семейства собачьих с p75 животных семейства собачьих в димерном формате была следующей: k_a (1/M*s) = 3,8E+7, k_d (1/c) = 0,1 и K_D = 2,7E-9 (фиг. 11). Кинетика связывания только NGF животных семейства собачьих с TrkA животных семейства собачьих в димерном формате была следующей: k_a (1/M*s) = 2,4E+7, k_d (1/c) = 1,6E-4 и K_D = 6,6E-12 (фиг. 12). Никакого связывания с рецепторами NGF животных семейства собачьих не наблюдалось при использовании только канинизированного антитела SC42_101 (данные не показаны). Как видно из сенсограмм (фиг. 13 и 14), канинизированное антитело SC42_101 эффективно блокирует связывание NGF животных семейства собачьих с TrkA и p75 животных семейства собачьих.

Пример 3

Фелинизация крысиного антитела 2166

База данных антител животных семейства кошачьих была создана путем проведения NGS (секвенирования нового поколения) на РВМС животных семейства кошачьих (моноклеарных клетках периферической крови). Эта база данных содержит последовательности из $7,5 \times 10^6$ доменов VH, $1,3 \times 10^6$ доменов VK и $3,8 \times 10^6$ доменов VL. Последовательности HCDR 1, 2 и LCDR 1, 2, 3 из родительского антитела 2166

использовали в алгоритме для идентификации ближайших последовательностей CDR животных семейства кошачьих и связанных с ними каркасных последовательностей в базе данных антител животных семейства кошачьих. Эти связанные каркасные последовательности были включены в библиотеку фагового дисплея scFv вместе с наиболее близкими каркасными последовательностями зародышевой линии, а связанные каркасные последовательности с 1-3 остатками вернулись обратно к ближайшей зародышевой линии. Для идентификации набора последовательностей CDR, которые аналогичны CDR исходного 2166 и ближе по идентичности к зародышевой линии и экспрессируемым последовательностям CDR, использовали проприетарный алгоритм. Эти CDR и каркасные последовательности были использованы для создания библиотеки фагового дисплея антител scFv с теоретической вариабельностью 3×10^{12} . Процессированная форма NGF животных семейства кошачьих (XP_004001166.1) идентична обработанной форме NGF животных семейства собачьих (NP_001181879.1), поэтому для исследований фелинизации использовали NGF животных семейства собачьих помечали на С-конце Flag-меткой (DYKDDDDK), описанной в Примере 1.

Фаговую селекцию антител завершали с использованием NGF на четыре раунда, и с каждым раундом строгость повышалась за счет снижения концентрации антигена и увеличения количества промываний. В частности, 96-луночные планшеты были покрыты 200 пмоль NGF для первого раунда, 100 пмоль для второго раунда и 50 пмоль для третьего и четвертого раундов. Количество промываний с помощью PBS-Tween-20 (0,01%) после селекции составило шесть для первого раунда, семь для второго раунда, восемь для третьего раунда и девять для четвертого раунда. Выходные клоны scFv из третьего и четвертого раундов секвенировали, а уникальные клоны переформатировали в IgG и проверяли на связывание с NGF с помощью SPR. Вариабельные домены клона 101 показаны на фиг. 15 с подчеркнутыми областями CDR. Аффинность фелинизированного клона 101 к NGF определяли методом SPR. Формат этого анализа заключался в иммобилизации козьего антитела к кошачьему IgG (30 мкг/мл) на биосенсоре серии S CM5 с использованием EDC/NHS и гашении оставшихся сайтов этаноламином. Захваченный фелинизированный клон 101 (1 мкг/мл) на сенсорном чипе с козьим антителом к кошачьему IgG. Используя кинетику одного цикла, было захвачено пять концентраций NGF. Кинетика связывания фелинизированного клона 101 с NGF была следующей: $k_a (1/M \cdot c) = 3,8E+5$, $k_d (1/c) = 3E-3$ и $K_D = 7,8E-9$.

Пример 4

Аффинное созревание фелинизированного клона 101 с использованием сайт-специфического мутагенеза CDR.

В первом подходе к созреванию аффинности переменный домен тяжелой цепи и домен CH1 клона 101 животных семейства кошачьих (таблица 3) были субклонированы в плазмиду GenScript FASEBA. Конструкция включала на C-конце тяжелой цепи (VH-CH1) метку однодоменного антитела к сывороточному альбумину (SASA) (см., например, US 2013/0129727A1), которое имеет низкую пикомолярную аффинность к альбумину, и дополнительно ниже His-метку для очищения. Переменный домен легкой цепи субклонировали с помощью Сκ животных семейства кошачьих (таблица 3) в проприетарный вектор экспрессии *E. coli*. Как тяжелая цепь, так и легкая цепь имели на N-конце сигнальный пептид PelB (пектатлиаза В), облегчающий секрецию Fab при экспрессии в TG1 *E. coli*. Экспрессию переменных доменов регулировали промотором Lac.

Таблица 3. Последовательности

VH-CH1 клона 101(IgG1)	DVQLVESGGD LVKPGGSLRL TCVASGLSLT SSSMSWVRQA PGKGLQWVST IYSNGGTYYT DSVKGRFTIS KDNAENTLYL QMNNLKTEDT ATYYCASIYY YDADYLHWYF DFWGQGalVT VSSASTTAPS VFPLAPSCGT TSGATVALAC LVLGYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QASGLYSLSS MVTVPSSRWL SDTFTCNVAH PPSNTKVDKT V
VL-Сκ1 клона 1	EIQMTQSPTS LSASVGDRTV ITCRASEGIS NNLSWYQQTP GKAPKLLIYA TSNLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ GYKWPLTFGG GTKLEITRSD AQPsvFLFQP SLDELHTGSA SIVCILNDFY PKEVNVKWKV DGVVQNKGIQ ESTTEQNSKD STYLSSTLT MSSTEYQSHE KFSCEVTHKS LASTLVKSFN RSECQRE

Библиотека вариантов была создана для каждого положения CDR в тяжелой и легкой цепях с использованием проприетарной библиотеки Precision Mutant Library (PML) от GenScript, в которой используется технология синтеза олигонуклеотидов на основе полупроводников. При создании мутантов CDR определяли с использованием комбинации методик по Kabat и IMGT, а остатки, выбранные для каждого CDR, показаны ниже в таблице 4. Номера остатков CDR показаны в скобках.

Таблица 4. Последовательности и нумерация CDR

	VH		VL
CDR1	GLSLTSSSMS (26-35)	CDR1	RASEGISNNLS (24-34)
CDR2	TIYSNGGTYYTDSVKG (50-65)	CDR2	ATSNLHS (50-56)
CDR3	ASIYYYDADYLHWYFDF (96-112)	CDR3	QQGYKWPLT (89-97)

Качество библиотек проверяли с помощью NGS (Секвенирование нового поколения, англ.: Next Generation Sequencing). Сорок четыре клон PML были выбраны из каждой библиотеки для экспрессии в *E. coli* в 96 планшетах с глубокими лунками путем инокуляции в среду 2YT и индукции с помощью 0,2 мМ IPTG в течение ночи при комнатной температуре. Fab, секретируемый в среду, анализировали на активность связывания путем проведения ИФА. В этом ИФА планшеты покрывали 10 мкг/мл BSA в течение ночи при 4°C, промывали 3 раза 0,1% Tween-20 в PBS, pH 7,4 (PBST), блокировали неспецифические взаимодействия 3% обезжиренным сухим молоком в PBS

(фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) при 37°C в течение 1 часа, промывали 3 раза PBST, добавляли неочищенный супернатант Fab (разбавленный 1:1 PBST), инкубировали при 37°C в течение 1 часа, промывали 3 раза PBST, добавляли 0,15 мкг/мл NGF инкубировали при 37°C в течение 1 часа, промывали 3 раза PBST, добавляли конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело к Flag-метке (Flag-метка присутствует на NGF), инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут, промывали 3 раза PBST и обнаруживали конъюгат HRP путем инкубации с субстратом TMB в течение 10 минут при комнатной температуре и измеряли поглощение при 450 нм. Лучшие 100 клонов с очевидным увеличением аффинности, измеренной с помощью ИФА, были секвенированы для обнаружения варианта в CDR, и было идентифицировано 57 уникальных клонов. Мутации из клона 101 для каждого из 57 клонов подсчитаны в таблице 5.

Таблица 5. Отдельные мутации в каждом положении по сравнению с клоном 101

	CDR1H				CDR2H							CDR3H				
	28	30	31	35	52	53	55	58	60	62	64	97	99	101	104	112
101	S	T	S	S	Y	S	G	Y	T	S	K	S	Y	Y	D	F
	H	N	H	V	W	P	R	D	H	D	E	Q	F	H	K	E
		R					Y		D		D	M			E	P
									S			N			N	H
									E			K			Q	N
												H				
												T				
	CDR1L				CDR2L											
	24	30	31	34	53	54	55	56								
101	R	S	N	S	N	L	H	S								
	F	A	Q	G	I	H	M	T								
		Q		A	V		I	D								
		V			K		L	E								
		L			H			N								
		P			M											
		Y			L											

Связывание 57 уникальных клонов было подтверждено с помощью скринингового анализа скорости диссоциации в анализе SPR, выполненного на Biacore T200. Для анализа SPR бычий сывороточный альбумин (BSA) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5. Поверхность сенсорного чипа активировали 50 ммоль/л N-гидроксисукцинимидом и 200 ммоль/л 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида в течение 420 с. После этого вводили BSA, разведенный в 10 mM ацетате натрия, pH 4,5. После реакции сочетания амина оставшиеся активные центры связывания на поверхности чипа блокировали 1 mM гидрохлорида этаноламина. Выбранные варианты Fab-SASA в кондиционированной среде были зафиксированы на чипах, покрытых BSA. Рабочий буфер представлял собой HBS-EP (10 mM HEPES, 500 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% Tween-20, pH 7,4). После уравнивания антиген вводили в течение 120 секунд (фаза ассоциации) с последующей инъекцией рабочего буфера в течение 420 секунд (фаза диссоциации). Скорости диссоциации клонов Fab-SASA были получены путем локальной

подгонки экспериментальных данных к модели взаимодействия 1:1 с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T200. Варианты Fab были ранжированы по их константам скорости диссоциации (скорости диссоциации, kd), показанным в таблице 6.

Таблица 6. Ранжирование вариантов Fab на основе констант диссоциации

Анализ последовательности	ka (1/M*c)	kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)	Соотношение kd-ДТ/ kd-клона
G55R	1,20E+05	1,47E-04	1,23E-09	19,7	0,00634	6,41
S30A	2,77E+05	2,92E-04	1,05E-09	152,2	0,618	3,23
H55M	3,33E+05	3,12E-04	9,35E-10	137,7	0,712	3,02
S30Q	2,59E+05	3,24E-04	1,25E-09	132,5	0,462	2,91
D104K	6,09E+04	3,32E-04	5,45E-09	64,6	0,0316	2,84
S35V	3,09E+05	3,60E-04	1,17E-09	106,1	0,414	2,62
N53I	2,76E+05	3,89E-04	1,41E-09	118	0,347	2,42
F112E	2,84E+05	3,99E-04	1,41E-09	147,2	0,488	2,36
S97Q	2,97E+05	4,03E-04	1,36E-09	79,5	0,287	2,34
N53V	2,88E+05	4,07E-04	1,42E-09	108,7	0,375	2,32
H55L	2,64E+05	4,18E-04	1,58E-09	91,8	0,494	2,26
G55Y	2,29E+05	4,19E-04	1,83E-09	17,7	0,0131	2,25
D104E	2,37E+05	4,26E-04	1,80E-09	66,4	0,126	2,21
H55I	3,34E+05	4,36E-04	1,31E-09	100,7	0,67	2,16
D104N	2,39E+05	4,46E-04	1,87E-09	52,8	0,0774	2,11
S97M	2,66E+05	4,66E-04	1,75E-09	64,3	0,149	2,02
Y99F	3,21E+05	4,69E-04	1,46E-09	100,8	0,439	2,01
K64E	1,96E+05	4,76E-04	2,42E-09	50,2	0,164	1,98
D104Q	2,20E+05	4,78E-04	2,17E-09	49,6	0,056	1,97
N31Q	3,27E+05	4,80E-04	1,47E-09	80,2	0,343	1,96
S97N	3,73E+05	4,81E-04	1,29E-09	69,6	0,317	1,96
S30V	2,87E+05	4,83E-04	1,68E-09	59,3	0,22	1,95
Y101H	3,07E+05	4,96E-04	1,62E-09	61,8	0,194	1,90
S30L	2,70E+05	5,07E-04	1,87E-09	92,6	0,914	1,86
S97K	3,31E+05	5,11E-04	1,54E-09	62,3	0,226	1,85
S34G	4,56E+05	5,14E-04	1,13E-09	65,8	0,571	1,83
S97H	2,97E+05	5,33E-04	1,79E-09	72	0,198	1,77
F112P	3,98E+05	5,52E-04	1,39E-09	48	0,164	1,71
K64D	3,40E+05	5,54E-04	1,63E-09	48,1	0,189	1,70
S62D	3,01E+05	5,60E-04	1,86E-09	103,3	0,405	1,68
L54H	3,40E+05	5,60E-04	1,65E-09	75,6	0,357	1,68
T60H	3,12E+05	5,61E-04	1,80E-09	77,5	0,316	1,68
Y58D	3,81E+05	5,62E-04	1,47E-09	108,4	0,571	1,68
T60D	2,94E+05	5,67E-04	1,93E-09	90,6	0,299	1,66
T60S	3,25E+05	5,73E-04	1,76E-09	80,6	0,33	1,65
N53K	2,92E+05	5,96E-04	2,04E-09	60,5	0,172	1,58
S31H	3,10E+05	6,12E-04	1,98E-09	66,6	0,291	1,54
N53H	3,22E+05	6,27E-04	1,95E-09	69,4	0,177	1,50
F112H	3,28E+05	6,39E-04	1,95E-09	81,8	0,407	1,48
F112N	3,47E+05	6,43E-04	1,85E-09	72	0,316	1,47
N53M	3,46E+05	6,48E-04	1,87E-09	53,7	0,312	1,46
Y52W	4,34E+05	6,51E-04	1,50E-09	41,3	0,258	1,45
R24F	2,87E+05	6,55E-04	2,28E-09	89,3	0,273	1,44
N53L	3,21E+05	6,67E-04	2,08E-09	60	0,188	1,41

S30P	2,62E+05	6,70E-04	2,56E-09	75,4	0,211	1,41
T60E	2,87E+05	6,83E-04	2,38E-09	77,7	0,289	1,38
S53P	3,23E+05	6,95E-04	2,15E-09	56,6	0,183	1,36
T30N	3,33E+05	7,04E-04	2,12E-09	71,2	0,287	1,34
F112E	2,94E+05	7,08E-04	2,41E-09	64,9	0,221	1,33
S56T	3,58E+05	7,14E-04	1,99E-09	65,5	0,414	1,32
S97T	3,80E+05	7,16E-04	1,88E-09	51,1	0,207	1,32
T30R	3,57E+05	7,30E-04	2,05E-09	61,2	0,261	1,29
S56D	3,72E+05	7,55E-04	2,03E-09	49,1	0,224	1,25
S30Y	3,55E+05	7,82E-04	2,20E-09	60,5	0,4	1,21
S34A	4,50E+05	7,83E-04	1,74E-09	50,4	0,361	1,20
S28H	3,15E+05	8,02E-04	2,55E-09	79,8	0,244	1,18
S56E	3,70E+05	8,09E-04	2,19E-09	54,6	0,249	1,17
S56N	3,41E+05	9,03E-04	2,64E-09	50,6	0,178	1,04
Дикий тип	3,59E+05	9,39E-04	2,62E-09	59,1	0,241	1,00
Дикий тип	3,55E+05	9,43E-04	2,655E-09			1,00
Дикий тип	3,51E+05	9,47E-04	2,69E-09	60,1	0,235	1,00

Для создания комбинаторной библиотеки были выбраны варианты Fab G55R, S30A, S30Q, S35V, N53I, F112E, S97Q и N53V (таблица 7).

Таблица 7. Выбранные варианты Fab для комбинаторной библиотеки

Положение	VH				VL	
	35	55	97	112	30	53
Дикий тип	S	G	S	F	S	N
Вариант	V	R	Q	E	A	I
					Q	V

Комбинаторную библиотеку конструировали на основе того же вектора Fab-SASA, который описан выше. Теоретическое разнообразие комбинаторной библиотеки составляет $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 3 \times 3 = 144$, а размер сконструированной библиотеки — $5,6 \times 10^7$ КОЕ (колониеобразующих единиц). Коэффициент и разнообразие в рамке считывания библиотеки оценивали с помощью секвенирования ДНК, результаты показаны в таблицах ниже.

Таблица 8. Процент конструкции Fab-SASA в рамке считывания в комбинаторной библиотеке

	Клоны для секвенирования	Последовательности со стоп-кодонами	Коэффициент в рамке считывания	Уникальные клоны
VH	47	3	44/47 = 93,6%	12
VL	47	2	45/47 = 95,7%	9

Таблица 9. Разнообразие вариантов тяжелых цепей в комбинаторной библиотеке

Цепь	Количество клонов	S35V	G55R	S97Q	F112E
VH	44	S(30), V(14)	G(10), R(34)	S(36), Q(8)	F(33), E(11)

Таблица 10. Разнообразие вариантов легких цепей в комбинаторной библиотеке

Цепь	Количество клонов	S30A/Q	N53I/V
VL	43	S(16), A(21), Q(8)	N(13), I(17), V(15)

Из комбинаторной библиотеки случайным образом выбрали 184 клон и завершили связывание с помощью ИФА NGF. ИФА NGF был тем же методом, что описан выше. 20 лучших клонов по связыванию в ИФА секвенировали и тестировали в анализе скорости

диссоциации SPR. Результаты связывания показаны по комбинациям аминокислот в таблице 11. В таблице 12 указаны идентификаторы последовательностей переменных доменов для 20 лучших клонов. Спаривание VH и VL указывает на существенную совместимость мутаций VH и VL и взаимозаменяемость доменов VH и VL.

Таблица 11. Варианты Fab со зрелой аффинностью из комбинаторной библиотеки

ID антитела	VH				VL		ka (1/M*c)	kd (1/c)	KD (M)	Соотношение (kd) ДТ / клоны	Соотношение (KD) ДТ / клоны	Rmax (RU)
	35	55	97	112	30	53						
AHF17591	V	R	S	E	A	I	2,68E+05	1,00E-06	3,73E-12	1685,00	925,94	19,3
AHF17598	V	R	S	E	A	I	2,94E+05	5,25E-05	1,79E-10	32,10	19,30	25,9
AHF17592	V	R	S	F	S	V	1,92E+05	1,46E-05	7,61E-11	115,41	45,40	28,5
AHF17600	V	R	S	F	S	V	1,77E+05	5,81E-05	3,29E-10	29,00	10,50	26,7
AHF17593	V	R	Q	F	A	V	1,63E+05	1,00E-06	6,13E-12	1685,00	563,17	24,4
AHF17594	V	G	S	F	A	V	3,53E+05	3,28E-04	9,31E-10	5,14	3,71	86,1
AHF17595	V	R	S	E	Q	N	1,78E+05	1,00E-06	5,62E-12	1685,00	614,99	41,6
AHF17596	V	R	S	F	A	V	2,27E+05	1,82E-05	8,02E-11	92,58	43,08	31,5
AHF17608	V	R	S	F	A	V	2,28E+05	1,00E-06	4,39E-12	1685,00	787,74	28,8
AHF17599	V	R	S	F	A	V	2,12E+05	1,00E-06	4,72E-12	1685,00	732,46	34,9
AHF17597	V	R	S	F	Q	I	1,99E+05	1,08E-05	5,44E-11	156,02	63,51	37,6
AHF17601	V	R	Q	E	A	N	2,91E+05	1,00E-06	3,44E-12	1685,00	1005,41	42,6
AHF17602	V	R	S	F	A	N	2,10E+05	1,00E-06	4,76E-12	1685,00	725,55	27,9
AHF17606	V	R	S	F	A	N	1,87E+05	2,01E-05	1,07E-10	83,83	32,29	46,3
AHF17610	V	R	S	F	A	N	1,82E+05	1,00E-06	5,49E-12	1685,00	628,81	35
AHF17610	V	R	S	F	A	N	1,82E+05	1,00E-06	5,49E-12	1685,00	628,81	35
AHF17603	V	G	S	E	A	I	3,68E+05	2,45E-04	6,64E-10	6,88	5,20	108,7
AHF17604	V	R	Q	F	Q	I	1,45E+05	4,66E-05	3,21E-10	36,16	10,76	27,9
AHF17605	V	G	Q	F	A	I	2,53E+05	2,07E-04	8,20E-10	8,14	4,21	94,2
AHF17607	V	R	S	E	S	I	2,26E+05	1,00E-06	4,42E-12	1685,00	780,83	36,9
AHF17609	V	R	S	F	A	I	2,28E+05	1,00E-06	4,39E-12	1685,00	787,74	35,9
Пустой							1,92E+04	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Пустой							1,45E+04	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Дикий тип							5,69E+05	1,79E-03	3,15E-09	0,94	0,00	28,7
Дикий тип							4,19E+05	1,58E-03	3,78E-09	1,07	0,00	30,2
Дикий тип							4,94E+05	1,69E-03	3,47E-09	1,00	0,00	29,45

Таблица 12. Последовательности переменных доменов VH и VL вариантов Fab с созревшей аффинностью

ID антитела	VH				VL			
	SEQ ID NO:	35	55	97	112	SEQ ID NO:	30	53
		S	G	S	F		S	N
AHF17591	184	V	R	S	E	198	A	I
AHF17598	184	V	R	S	E	198	A	I
AHF17592	188	V	R	S	F	192	S	V
AHF17600	188	V	R	S	F	192	S	V
AHF17593	185	V	R	Q	F	193	A	V
AHF17594	186	V	G	S	F	193	A	V
AHF17595	184	V	R	S	E	194	Q	N
AHF17596	188	V	R	S	F	193	A	V
AHF17608	188	V	R	S	F	193	A	V
AHF17599	188	V	R	S	F	193	A	V
AHF17597	188	V	R	S	F	195	Q	I
AHF17601	187	V	R	Q	E	196	A	N
AHF17602	188	V	R	S	F	196	A	N
AHF17606	188	V	R	S	F	196	A	N

AHF17610	188	V	R	S	F	196	A	N
AHF17610	188	V	R	S	F	196	A	N
AHF17603	189	V	G	S	E	198	A	I
AHF17604	187	V	R	Q	F	195	Q	I
AHF17605	190	V	G	Q	F	198	A	I
AHF17607	184	V	R	S	E	197	S	I
AHF17609	188	V	R	S	F	198	A	I

Пример 5

Созревание аффинности клона 101 животных семейства кошачьих с помощью фагового дисплея scFv

Во втором подходе к созреванию аффинности была создана библиотека фагового дисплея scFv, содержащая каркасы фелинизированного клона 101 и следующие последовательности для последовательностей CDR тяжелых и легких цепей, показанных в таблице 13.

Таблица 13. CDR фелинизированного клона 101 и вариантов в комбинаторной библиотеке фагового дисплея scFv

HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
GLSLTSSS		ASIIYYDADYLHWYDFD			
----H-		-N-----			
----TN-		-E-----			
--E--N-		-Q-----			
A-----		-D-----			
L-----		-K-----	EGISNN		
N-----		--L-----	Q----		QQGYKWPLT
--E----		--T-----	N----		--W----
--G----		--W-----	K----		--H----
--A----		--F-----	-A---		--F----
--D----		--H-----	--L--	ATS	--R----
--T----	IYSNGGT	---F-----	--V--	--E	---E---
---M---	-W----	----E-----	--G--	-S-	---S---
---V---	--Q---	----S-----	--D--	--N	---Q---
---A---	--A---	----V-----	---S-	--D	----F--
---S---	--E---	----E-----	---K-	--Q	----I--
---V---	--R---	----H-----	---Y-	--K	----E--
---N---	--S---	-A-----	---S	-A-	----M-
---M---	LW----	-Y-----	---G	-Q-	--S---
---TH-	-W-S---	-T-----	---Q	-D-	--T---
---H-	-W-E---	-V-----	---E	-Y-	--H---
---G--	-W-D---	-L-----	---K	-V-	--G----
---E--		-P-----	---D	-L-	--L----
---R--		-H-----	---T		--V----
---K--		-R-----	---L		--R----
----I-		-I-----	---A		--D----
----T-		-G-----	---H		---K----
----D-		--Y-----	---F		--Y-ST-W-
----N-		S-----	---R		
----Q-		T-----			
----A-		D-----			
Q-----		N-----			
----Y-		E-----			
----A		Q-----			

----A--		K-----			
--Y----		--Y-----M			
--M----		--W-----			
		-D-F-----			
		-N-W-----			
		-Q--F-----			
		-----E-E-----			
		-----SY-----			
		-----Y-----			
		-----Y-----			
		-----F-----			
		-----F-----			
		-----L-----			
		-----W-----			
		-----I-----			
		-----D-----			
		-----Q-----			
		-----YF-----			
		-----Y-----			
		-----L-----			
		-----M-----			
		-----I-----			
		-----W-----			

Разнообразие библиотеки для тяжелой цепи составляло 37 (HCDR1) x 11 (HCDR2) x 57 (HCDR3) = 23 199, а для легкой цепи составляло 24 (LCDR1) x 13 (LCDR2) x 22 (LCDR3) = 6 864. Библиотека, содержащая комбинированные тяжелые и легкие цепи, имеет разнообразие $1,59 \times 10^8$. Фаговую селекцию антител завершали с использованием NGF на пять раундов, и с каждым раундом строгость повышалась за счет снижения концентрации антигена и увеличения количества промываний. В частности, 96-луночные планшеты были покрыты 200 пмоль NGF для первого раунда, 50 пмоль NGF для второго и третьего раундов, 25 пмоль для четвертого раунда и 10 пмоль для пятого раунда. Количество промываний PBS, pH 7,4-Tween-20 (0,01%) после этапа отбора составило три после первого раунда, четыре после второго раунда, пять после третьего раунда, шесть после четвертого раунда и семь после пятого раунда. Выделили 760 клональных фагов из каждого из выходов третьего, четвертого и пятого раундов, которые подвергали скринингу с помощью NGF-связывающего ИФА. Положительные клоны были секвенированы, и 140 уникальных положительных клонов были реформатированы в IgG1a животных семейства кошачьих, экспрессированы в клетках CHO и очищены с белком А. SPR завершился соединением антитела с амином (~5 мкг/мл) с сенсорным чипом HC30M с помощью активации EDC/NHS с последующим гашением этаноламином HCL. NGF представлял собой аналит, разведенный в HEPES-буферном солевом растворе с 0,01% Tween-20 и 0,5 мг/мл BSA. NGF использовали в концентрациях 500, 166, 55, 18, 6,2, 2,0, 0,68 и 0,23 нМ. Аффинность трех лучших клонов с созревшей аффинностью показана ниже в таблице 14. Последовательности переменных доменов

трех лучших клонов (SC-184_76; SC-184_102; SC-184_110) показаны на фиг. 17.

Таблица 14. Данные SPR трех лучших антител животных семейства кошачьих с созревшей аффинностью

Клон	k_a (1/M*c)	k_d (1/c)	KD (M)
101	1,10E+05	2,20E-04	2,10E-09
SC-184_76	2,70E+05	6,90E-05	2,50E-10
SC-184_102	2,10E+05	6,30E-05	6,30E-10
SC-184_110	1,60E+05	3,60E-05	3,60E-10

Пример 6

Данные о блокировании рецепторов SPR и NGF антител животных семейства кошачьих с созревшей аффинностью, направленными против NGF животных семейства кошачьих

Антитела с созревшей аффинностью ANF17602, SC-184_76, SC-184_102 и SC-184_110 вместе с тремя последними клонами, содержащими мутацию G55R (SC-184_76-Arg, SC-184_102-Arg и SC-184_110-Arg), описанные в первый подход к созреванию аффинности, оценивали на предмет их аффинности к NGF с использованием SPR с прибором Biacore T200. Последовательности варибельного домена ANF17602, SC-184_76-Arg, SC-184_102-Arg и SC-184_110-Arg показаны на фиг. 17. Кроме того, оценивали также клон 101. Антитела были захвачены с использованием чипа CM5, связанного с анти-кошачьими антителами. Затем оценивали связывание NGF при нескольких концентрациях, начиная с 50 нМ, с использованием рабочего буфера PBSP+ (Cytiva) со скоростью потока 30 μ л/мин. Продолжительность времени ассоциации составляла 120 с, а время диссоциации - 600 с. Поверхность чипа регенерировали с помощью 10 мМ глицина. Сенсограммы с вычитанием эталона были адаптированы к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore T100 Evaluation. Данные показаны в таблице 15 ниже, а сенсограммы - на фиг. 18.

Таблица 15. Аффинность антител к NGF животных семейства кошачьих

Клон	k_a (1/M*c)	k_d (1/c)	KD	Rmax (RU)
101	7,84E+05	1,38E-03	1,75E-09	26,3
ANF17602	3,94E+05	6,32E-05	1,61E-10	61,4
SC-184_76	8,38E+05	3,96E-04	4,72E-10	61,9
SC-184_76-Arg	5,85E+05	9,01E-05	1,54E-10	73,4
SC-184_102	4,71E+05	1,98E-04	4,20E-10	82,1
SC-184_102-Arg	3,43E+05	4,43E-05	1,29E-10	87,8
SC-184_110	4,92E+05	3,80E-04	7,73E-10	43,2
SC-184_110-Arg	3,87E+05	5,48E-05	1,42E-10	53,2

Для экспериментов по блокированию рецепторов NGF были созданы рецепторы NGF TrkA и p75 животных семейства кошачьих, которые использовались в эксперименте SPR с Biacore T200. Внеклеточный домен TrkA животных семейства кошачьих (XP_023103311) был клонирован с AviTag (GLNDIFEAQKIEWHE) и 8X His-меткой на C-

конце и экспрессирован в клетках HEK293. Рекомбинантный белок TrkA животных семейства кошачьих очищали из кондиционированной среды с помощью хроматографии на никелевой колонке. Внеклеточный домен p75 животных семейства кошачьих (XP_023099534) был клонирован с AviTag (GLNDIFEAQKIEWNE) и 8X His-меткой на C-конце и экспрессирован в клетках HEK293. Рекомбинантный белок p75 животных семейства кошачьих очищали из кондиционированной среды с помощью хроматографии на никелевой колонке. Оба рецептора были биотинилированы по сайту AviTag с использованием набора для реакции биотин-протеин-лигазы BirA (Avidity). Биотинилированные рецепторы захватывали на чипе CAP серии S и реагентом Biotin CAPture (Cytiva). Антитела титровали в рабочем буфере (1 X PBSP+, Cytiva) и предварительно инкубировали с 10 нМ NGF (анализ на TrkA) или 50 нМ NGF (анализ на p75) в указанных соотношениях. Связывание оценивали путем введения этих образцов через захваченный рецептор в течение 180 с. R_{max} использовался для расчета процента ингибирования путем деления R_{max} предварительно смешанных образцов на среднее значение R_{max} образцов, содержащих только NGF, которые собирали в ходе анализа. Способность каждого антитела блокировать связывание NGF с TrkA и p75 животных семейства кошачьих показана в таблице 16.

Таблица 16. Антитела, блокирующие способность NGF связываться с рецептором NGF

Клон	TrkA		p75	
	Соотношение Ат к NGF	% Блокирования	Соотношение Ат к NGF	% Блокирования
101	10 к 1	15	1 к 1	42
101	50 к 1	76	5 к 1	87
SC-184 76-Arg	10 к 1	99	1 к 1	100
SC-184 76-Arg	50 к 1	100	5 к 1	100
SC-184 110-Arg	10 к 1	100	1 к 1	100
SC-184 110-Arg	50 к 1	100	5 к 1	100
AHF17602	10 к 1	99	1 к 1	100
AHF17602	50 к 1	100	5 к 1	100

Пример 7

Тестирование мутации созревания аффинности G55R в клоне SC-42_101_006 животных семейства собачьих.

Клон 101 животных семейства кошачьих имеет значительное сходство CDR с клоном SC-42_101_006 животных семейства собачьих (домен V_H SC-42_101; домен V_L SC-42_006). Клон AHF17602 животных семейства кошачьих с созревшей аффинностью удаляет потенциальный сайт дезамидирования NGF путем мутации G55R, и этот потенциальный сайт дезамидирования также существует в клонах животных семейства собачьих. Клон SC-42_101_006 был мутирован в R55, и как родительский вариант, так и

вариант R55 были временно экспрессированы в клетках CHO и очищены с белком А. Последовательности варибельного домена показаны на фиг. 1 и фиг. 2. Аффинность к NGF оценивали с помощью SPR с прибором Biacore T200. Антитела захватывали с помощью чипа на основе белка А серии S. Затем оценивали связывание NGF при нескольких концентрациях, начиная с 50 нМ, с использованием рабочего буфера PBSP+ (Cytiva) со скоростью потока 30 μ л/мин. Продолжительность времени ассоциации составляла 120 с, а время диссоциации - 600 с. Поверхность чипа регенерировали с помощью 10 мМ глицина. Сенсограммы с вычитанием эталона были адаптированы к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation. Данные показаны в таблице 17 ниже.

Таблица 17. Аффинность антител к NGF животных семейства собачьих

Клон	k_a (1/M*s)	k_d (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)
SC-42 101 006	1,51E+06	1,74E-04	1,15E-10	46,7
SC-42 101 006-Arg	1,38E+06	1,89E-04	1,39E-10	39

Изобретение далее описано в следующих пронумерованных абзацах:

1. Выделенный белок, который специфически связывается с NGF семейства собачьих, который содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит:

(a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO:146), где X_1 включает А, G или N, X_2 включает L или M, X_3 включает А, D, E или S, X_4 включает F, I, L, M или V, X_5 включает N или T, X_6 включает E, S или T, X_7 включает G, H, N, S или Q, и X_8 включает А или S;

(b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность X_1X_2SNGGT (SEQ ID NO:147), где X_1 включает I или L, X_2 включает W или Y;

(c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $AX_2IX_4X_5YX_7X_8X_9Y LX_{12}X_{13}YX_{15}X_{16}X_{17}$ (SEQ ID NO:148), где X_2 включает D, E, K, N, Q, S или T, X_4 включает W или Y, X_5 включает F, H, W или Y, X_7 включает D или E, X_8 включает А или S, X_9 включает D или Y, X_{12} включает H или Y, X_{13} включает F или W, X_{15} включает F, I, L, W или Y, X_{16} включает D или Q, и X_{17} включает F, I, L, M, W или Y;

(d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2IX_4X_5X_6$ (SEQ ID NO:149), где X_1 включает D, E или K, X_2 включает А, G или N, X_4 включает G, N, Q или S, X_5 включает N или S, X_6 включает А, G, N, S или T;

(e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2),

содержащую аминокислотную последовательность AX₂X₃ (SEQ ID NO:150), где X₂ включает A, S или T, X₃ включает A, D, E, N, Q, S или T; и

(f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QX₂GX₄X₅X₆PX₈T (SEQ ID NO:151), где X₂ включает H или Q, X₄ включает F, H, W или Y, X₅ включает K или Q, X₆ включает F или W, и X₈ включает L или M.

2. Белок по абзацу 1, который содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит:

(a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄TX₆X₇S (SEQ ID NO:152), где X₁ включает A или G, X₂ включает L или M, X₃ включает E или S, X₄ включает F или L, X₆ включает S или T, и X₇ включает H, N или S;

(b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность IWSNGGT (SEQ ID NO:153);

(c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность AX₂IY₇Y₈Y₉Y₁₀Y₁₁Y₁₂ADYLHX₁₃YX₁₅DX₁₇ (SEQ ID NO:154), где X₂ включает N, Q или S, X₇ включает D или E, X₁₃ включает F или W, X₁₅ включает F, I, L, W или Y, и X₁₇ включает F, I, L или M;

(d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность X₁GIX₄NX₆ (SEQ ID NO:155), где X₁ включает D или E, X₄ включает Q или S, X₆ включает G, N, S или T;

(e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность ATX₃ (SEQ ID NO:156), где X₃ включает D, E, N, Q или S; и

(f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QQGX₄X₅X₆PLT (SEQ ID NO:157), где X₄ включает F, H или Y, X₅ включает K или Q, и X₆ включает F или W.

3. Белок по абзацу 1 или 2, который содержит не более двух (2) изменений в VH-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 137 и не более двух (2) изменений в VL-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 138.

4. Белок по абзацу 1 или 2, который содержит не более одного (1) изменения в VH-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 137 и не более одного (1) изменения в VL-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 138.

5. Белок по любому из абзацев 1-4, который содержит каркас тяжелой цепи (FR1H+FR2H+FR3H+FR4H), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или

по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93% или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:137 или SEQ ID NO:141.

6. Белок по любому из абзацев 1-5, который содержит каркас легкой цепи (FR1L+FR2L+FR3L+FR4L), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93% или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

7. Белок по любому из абзацев 1-6, который содержит домен V_H , содержащий SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:137 или SEQ ID NO:141.

8. Белок по любому из абзацев 1-7, который содержит домен V_L , содержащий SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

9. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело к NGF или фрагмент антитела к NGF по любому из абзацев 1-8.

10. Вектор, который содержит нуклеиновую кислоту по абзацу 9.

11. Рекомбинантная клетка, которая содержит нуклеиновую кислоту по любому из абзацев 9 или 10.

12. Клетка, которая экспрессирует белок по любому из абзацев 1, терапевтически эффективное количество белка к NGF по любому из абзацев 1-8 или нуклеиновую кислоту по абзацам 9 или 10.

13. Способ получения белка к NGF по любому из абзацев 1-8, который включает культивирование клетки-хозяина по абзацу 11 в условиях, которые приводят к получению белка к NGF.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество белка к NGF по любому из абзацев 1-8.

15. Способ лечения боли у субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества белка к NGF по любому из абзацев 1-8.

16. Способ по абзацу 15, в котором боль включает воспалительную боль, боль после операционного разреза, боль при раке, боль при первичном или метастатическом

раке кости, боль при переломе, боль при остеопорозном переломе, боль в результате ожога, боль от травмы, скелетно-мышечную боль, ревматическую боль или боль при остеопорозе.

17. Способ по абзацу 16, в котором субъект включает животное семейства собачьих.

18. Способ по абзацу 16, в котором субъект включает животное семейства кошачьих.

19. Способ по абзацу 16, в котором субъект включает человека.

20. Способ обнаружения NGF в образце, включающий инкубацию образца, содержащего NGF, в присутствии белка к NGF по любому из абзацев 1-8 и обнаружение белка к NGF, связанного с NGF, в образце.

* * *

Таким образом, подробно описав предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение, определенное вышеприведенными абзацами, не должно ограничиваться конкретными деталями, изложенными в приведенном выше описании, поскольку возможны многие его очевидные вариации без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с фактором роста нервов (NGF), который содержит

(a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO:146), где X_1 включает A, G или N, X_2 включает L или M, X_3 включает A, D, E или S, X_4 включает F, I, L, M или V, X_5 включает N или T, X_6 включает E, S или T, X_7 включает G, H, N, S или Q, и X_8 включает A или S;

(b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2SNX_5GT$ (SEQ ID NO:147), где X_1 включает I или L, X_2 включает W или Y, и X_5 включает G или R;

(c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $AX_2IX_4X_5YX_7X_8X_9YLY_{12}X_{13}YX_{15}X_{16}X_{17}$ (SEQ ID NO:148), где X_2 включает D, E, K, N, Q, S или T, X_4 включает W или Y, X_5 включает F, H, W или Y, X_7 включает D или E, X_8 включает A или S, X_9 включает D или Y, X_{12} включает H или Y, X_{13} включает F или W, X_{15} включает F, I, L, W или Y, X_{16} включает D или Q, и X_{17} включает F, I, L, M, W или Y;

(d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2IX_4X_5X_6$ (SEQ ID NO:149), где X_1 включает D, E или K, X_2 включает A, G или N, X_4 включает G, N, Q или S, X_5 включает N или S, X_6 включает A, G, N, S или T;

(e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность AX_2X_3 (SEQ ID NO:150), где X_2 включает A, S или T, X_3 включает A, D, E, N, Q, S или T; и

(f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $QX_2GX_4X_5X_6PX_8T$ (SEQ ID NO:151), где X_2 включает H или Q, X_4 включает F, H, W или Y, X_5 включает K или Q, X_6 включает F или W, и X_8 включает L или M.

2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, который содержит

(a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4TX_6X_7S$ (SEQ ID NO:152), где X_1 включает A или G, X_2 включает L или M, X_3 включает E или S, X_4 включает F или L, X_6 включает S или T, и X_7 включает H, N или S;

(b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность $IWSNX_5GT$ (SEQ ID NO:153), где X_5

включает G или R;

(с) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность AX₂IY₇Y₇X₇ADYLHX₁₃YX₁₅DX₁₇ (SEQ ID NO:154), где X₂ включает N, Q или S, X₇ включает D или E, X₁₃ включает F или W, X₁₅ включает F, I, L, W или Y, и X₁₇ включает F, I, L или M;

(d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность X₁GIX₄NX₆ (SEQ ID NO:155), где X₁ включает D или E, X₄ включает Q или S, X₆ включает G, N, S или T;

(е) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность ATX₃ (SEQ ID NO:156), где X₃ включает D, E, N, Q или S; и

(f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QQGX₄X₅X₆PLT (SEQ ID NO:157), где X₄ включает F, H или Y, X₅ включает K или Q, и X₆ включает F или W.

3. Антигенсвязывающий белок по п. 1 или п. 2, который содержит не более двух (2) замен в VH-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 137 и не более двух (2) замен в VL-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 138.

4. Антигенсвязывающий белок по п. 1 или п. 2, который содержит не более одной (1) замены в VH-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 137 и не более одной (1) замены в VL-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 138.

5. Антигенсвязывающий белок по п. 1, который содержит одну или более VH-CDR с любой из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:141 или SEQ ID NO:207 и одну или более VL-CDR с SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

6. Антигенсвязывающий белок по п. 1, который содержит VH-CDR с любой из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:141 или SEQ ID NO:207 и VL-CDR с SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14,

SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

7. Антигенсвязывающий белок по п. 1, который содержит VH-CDR и VL-CDR из 2166, SC-42_006, SC-42_007, SC-42_008, SC-42_010, SC-42_011, SC-42_023, SC-42_032, SC-42_045, SC-42_047, SC-42_048, SC-42_052, SC-42_070, SC-42_073, SC-42_077, SC-42_082, SC-42_090 или SC-42_101.

8. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что CDR соответствуют системе IMGT.

9. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что CDR соответствуют системе Kabat.

10. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что CDR соответствуют системе Chothia.

11. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-7, который содержит каркас тяжелой цепи (FR1H+FR2H+FR3H+FR4H), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:141 или SEQ ID NO:207.

12. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-11, который содержит каркас легкой цепи (FR1L+FR2L+FR3L+FR4L), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

13. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-12, который содержит домен V_H, по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:133, SEQ ID

NO:137, SEQ ID NO:141 или SEQ ID NO:207.

14. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-13, который содержит домен VL, по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:138 или SEQ ID NO:142.

15. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с NGF, который содержит

(а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1LX_3X_4X_5X_6X_7X_8MX_{10}$, где X_1 включает A, G, L, N или Q, X_3 включает A, D, E, G, H, I, M, S, T или Y, X_4 включает L, M или V, X_5 включает A, M, N, R, S, T или V, X_6 включает A, E, G, H, K, R, S или T, X_7 включает A, D, H, I, N, Q, S, T или Y, X_8 включает A, X_9 включает S, и X_{10} включает S или V;

(b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5GTGX_8YX_{10}DX_{12}VX_{14}$, где X_1 включает I или L, X_2 включает W или Y; X_3 включает A, P или S, X_4 включает D, E, N, Q, R или S, X_5 включает G, R или Y, X_8 включает D или Y, X_{10} включает D, E, H, S или T, X_{12} включает D или S, и X_{14} включает D, E или K;

(с) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}LX_{12}X_{13}X_{14}FX_{16}X_{17}$, где X_1 включает A, D, E, K, N, Q, S или T, X_2 включает A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V или Y, X_3 включает I, L, W или Y, X_4 включает F, T, W или Y, X_5 включает F, H или Y, X_6 включает H или Y, X_7 включает D или E, X_8 включает A, S или V, X_9 включает D, E, H, K, N, Q или Y, X_{10} включает F, H или Y, X_{12} включает H или Y, X_{13} включает F или W, X_{14} включает D, I, L, W или Y, X_{16} включает D или Q, и X_{17} включает E, F, H, I, L, M, N, P, W или Y;

(d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность $X_1ASX_4X_5X_6X_7X_8X_9LX_{11}$, где X_1 включает F или R, X_4 включает E, K или N, X_5 включает A или G, X_6 включает I, L или V, X_7 включает A, D, G, L, P, Q, S, V или Y, X_8 включает K, Q, N, S или Y, X_9 включает A, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, S или T, и X_{11} включает A, G или S;

(е) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность $AX_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где X_2 включает A,

D, L, Q, S, T, V или Y, X₃ включает D, E, K, N, Q или S, X₄ включает H, I, K, L, M, N или V; X₅ включает H или L, X₆ включает H, I, L или M, и X₇ включает D, E, N, S или T;

(f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность QQX₃X₄X₅X₆X₇X₈T, где X₃ включает G или Y, X₄ включает D, F, G, H, K, L, R, S, T, V, W или Y, X₅ включает E, K, Q, R или S, X₆ включает I, F, T или W, X₇ включает E или P, и X₈ включает L, M или W.

16. Антигенсвязывающий белок по п. 15, в котором

VH-CDR1 содержит GLSLTSX₇SMX₁₀, где X₇ включает A, D или N, и X₁₀ включает S или V;

VH-CDR2 содержит X₁X₂SNX₅GT, где X₁ включает I или L, X₂ включает W или Y, и X₅ включает G или R;

VH-CDR3 содержит ASIYYX₇AX₉YLHWYFDX₁₂, где X₇ включает D или E, X₉ включает D или E, и X₁₂ включает E или F;

VL-CDR1 содержит RASX₄GIX₇X₈NLS, где X₄ включает E или K, X₇ включает A, Q или S, X₈ включает K или N;

VL-CDR2 содержит AX₂X₃X₄LHS, где X₂ включает Q или T, X₃ включает D или S, и X₄ включает I, N или V; и

VL-CDR3 содержит QGX₄KWPLT, где X₄ включает F, W или Y.

17. Антигенсвязывающий белок по п. 15 или п. 16, который содержит не более двух (2) замен в VH-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 204 и не более двух (2) замен в VL-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 199.

18. Антигенсвязывающий белок по п. 15 или п. 16, который содержит не более одной (1) замены в VH-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 204 и не более одной (1) замены в VL-CDR по сравнению с SEQ ID NO: 199.

19. Антигенсвязывающий белок по п. 15, который содержит одну или более VH-CDR с любой из SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205 или SEQ ID NO:206 и одну или более VL-CDR с любой из SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201 или SEQ ID NO:203.

20. Антигенсвязывающий белок по п. 15, который содержит VH-CDR с любой из SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205 или SEQ ID NO:206 и VL-CDR с любой из SEQ

ID NO:142, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201 или SEQ ID NO:203.

21. Антигенсвязывающий белок по п. 15, который содержит VH-CDR и VL-CDR клона AHF17591, AHF17592, AHF17593, AHF17595, AHF17597, AHF17602, AHF17607, SC-184_76, SC-184_102, SC-184_110, SC-184_76-Arg, SC-184_102-Arg или SC-184_110-Arg.

22. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 15-21, который содержит каркас тяжелой цепи (FR1H+FR2H+FR3H+FR4H), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205 или SEQ ID NO:206.

23. Белок по любому из пп. 15-22, который содержит каркас легкой цепи (FR1L+FR2L+FR3L+FR4L), по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93% или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201 или SEQ ID NO:203.

24. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 15-23, который содержит домен V_H, по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:205 или SEQ ID NO:206.

25. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 15-24, который содержит домен V_H, по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 93%, или по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201 или SEQ ID NO:203.

26. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело к NGF или фрагмент антитела к NGF по любому из пп. 1-25.

27. Вектор, который содержит нуклеиновую кислоту по п. 26.

28. Рекомбинантная клетка, которая содержит нуклеиновую кислоту по любому из

пп. 26 или 27.

29. Клетка, которая экспрессирует антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-25 или нуклеиновую кислоту по п. 26 или п. 27.

30. Способ получения антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-25, который включает культивирование клетки по п. 29 в условиях, которые приводят к получению антигенсвязывающего белка.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество белка к NGF по любому из пп. 1-25.

32. Способ лечения или уменьшения боли у субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества белка к NGF по любому из пп. 1-25.

33. Способ по п. 32, в котором боль включает воспалительную боль, боль после операционного разреза, боль при раке, боль при первичном или метастатическом раке кости, боль при переломе, боль при остеопорозном переломе, боль в результате ожога, боль от травмы, скелетно-мышечную боль, ревматическую боль или боль при остеопорозе.

34. Способ по п. 33, в котором субъект включает животное семейства собачьих.

35. Способ по п. 33, в котором субъект включает животное семейства кошачьих.

36. Способ по п. 33, в котором субъект включает человека.

37. Способ обнаружения NGF в образце, включающий инкубацию образца, содержащего NGF, в присутствии белка к NGF по любому из пп. 1-25 и обнаружение белка к NGF, связанного с NGF, в образце.

SEQ ID NO:	Название клона	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
1	2166	QVQLKESGPGLVQPSQTLTSLTCTVS	GLSLTSNS	VSWIRQPPGKGLEWMGV	IWSNGGT
3	SC-42_006	EVQLVESGGDLVQPAGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWVRQAPEKGLQLVAT	IWSNGGT
5	SC-42_007	EVQLVESGGDLVAPSQSLTITCTVS	GLSLTSNA	ISWVRQPPGRGLEWLGT	IWSNGGT
7	SC-42_008	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLELTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVGV	LWSNGGT
9	SC-42_010	EVQLVESGGDLVKPEGSLSLSCVVS	GLSLTSNA	MSWVRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
11	SC-42_011	EVQLVESGGDLVAPSQSLTITCTVS	GLSLTENS	ISWVRQPPGRGLEWLGV	IWSNGGT
13	SC-42_023	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
15	SC-42_024	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
17	SC-42_025	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
19	SC-42_026	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
21	SC-42_027	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
23	SC-42_028	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
25	SC-42_029	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
27	SC-42_030	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
29	SC-42_031	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
31	SC-42_032	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
33	SC-42_033	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
35	SC-42_034	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
37	SC-42_035	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
39	SC-42_036	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
41	SC-42_037	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
43	SC-42_038	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
45	SC-42_040	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
47	SC-42_041	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT

Фиг. 1A

SEQ ID NO:	Название клона	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
49	SC-42_042	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
51	SC-42_043	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
53	SC-42_044	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
55	SC-42_045	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
57	SC-42_046	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
59	SC-42_047	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
61	SC-42_048	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
63	SC-42_049	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
65	SC-42_050	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
67	SC-42_051	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
69	SC-42_052	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
71	SC-42_053	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
73	SC-42_054	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
75	SC-42_055	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
77	SC-42_057	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
79	SC-42_058	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
81	SC-42_059	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
83	SC-42_060	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
85	SC-42_061	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
87	SC-42_062	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
89	SC-42_063	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
91	SC-42_064	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
93	SC-42_065	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
95	SC-42_066	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT

Фиг. 1А Продолжение

SEQ ID NO:	Название клона	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
97	SC-42_067	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
99	SC-42_068	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
101	SC-42_069	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
103	SC-42_070	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
105	SC-42_071	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLSLTSGS	MSWVRQAPGKGLQWVGV	IYSNGGT
107	SC-42_072	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVVS	GLDLTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVTV	IWSNGGS
109	SC-42_073	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	ALSLTSNS	MSWVRQAPGKGLQLVAT	IWSNGGT
111	SC-42_075	EVQLVESGGDLVQPAGSLRLSCVAS	GLSLTSQS	MSWVRQAPGKGLQLVAI	IWSNGGT
113	SC-42_077	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVVS	GLSLTTNS	MSWVRQAPGKGLQWVTT	IWSNGGT
115	SC-42_079	EVQLVESGGDLVKPGGSLSLSCVAS	GLSVTSNS	MDWVRQAPGKGLQWLST	IWSNGGT
117	SC-42_080	EVQLVESGGDLVKPEGSLSLSCVVS	GLSLTSSS	MSWVRQAPGKGLEWVAT	IWSNGGT
119	SC-42_081	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLTCVVS	GLSMTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
121	SC-42_082	EVQLVESGGDLVAPSQSL SITCTVS	GLSLTSHS	ISWVRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
123	SC-42_083	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLSLTSNG	MSWVRQAPGKGLEWVAT	IWSNGGT
125	SC-42_084	EVQLVESGGDLVKPEGSLSLSCVVS	GLSLTSHS	MSWVRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
127	SC-42_085	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLELTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVGT	IWSNGGT
129	SC-42_088	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWVRQAPEKGLQLVAT	IWSNGGT
131	SC-42_089	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWVRQAPGKGLQLVAT	IWSNGGT
133	SC-42_090	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	GLSFTSNS	MSWVRQAPGKGLQLVAT	IWSNGGT
135	SC-42_091	EVQLVESGGDLVKPGGSLSLSCVAS	GLSLTSHS	MDWVRQAPGKGLQWLST	IWSNGGT
137	SC-42_101	EVQLVESGGDLVAPSQSL SITCTVS	GMSLTSNS	ISWVRQPPGRGLEWLGT	IWSNGGT
207	SC-42_101R	EVQLVESGGDLVAPSQSL SITCTVS	GMSLTSNS	ISWVRQPPGRGLEWLGT	IWSNRGT
139	SC-42_102	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	GLGLTSNS	MSWVRQAPEKGLQLVAV	IWSNGGT

Фиг. 1А Продолжение

SEQ ID NO:	Название клона	FR3H	CDR3H	FR4
1	2166	DYNSAIESRLSINRDTSKSQVFLKMNSLQPEDTAMYFC	ASIIYYDADYLHWYFDF	WGPGLMVTVSS
3	SC-42_006	QYTDVAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ATIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
5	SC-42_007	SYTDVAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTARYYC	ASIIYYDADYLHWYFDM	WGQGLVTVSS
7	SC-42_008	DYTDVAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTARYYC	ASIIYYDADYLHWYFDY	WGQGLVTVSS
9	SC-42_010	DYTDVAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTARYYC	ASIIYYDADYLHWYDF	WGQGLVTVSS
11	SC-42_011	SYNSAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYDF	WGPGLVTVSS
13	SC-42_023	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDL	WGQGLVTVSS
15	SC-42_024	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWFYDF	WGQGLVTVSS
17	SC-42_025	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYFYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
19	SC-42_026	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYFYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
21	SC-42_027	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYDF	WGQGLVTVSS
23	SC-42_028	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ADIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
25	SC-42_029	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYDF	WGQGLVTVSS
27	SC-42_030	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
29	SC-42_031	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYDF	WGQGLVTVSS
31	SC-42_032	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDM	WGQGLVTVSS
33	SC-42_033	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
35	SC-42_034	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
37	SC-42_035	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDI	WGQGLVTVSS
39	SC-42_036	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AEIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
41	SC-42_037	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYWDF	WGQGLVTVSS
43	SC-42_038	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AQIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
45	SC-42_040	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDW	WGQGLVTVSS
47	SC-42_041	DYTDVAVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AQIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS

Фиг. 1B

SEQ ID NO:	Название клона	FR3H	CDR3H	FR4
49	SC-42_042	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYYDF	WGQGLVTVSS
51	SC-42_043	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ADIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
53	SC-42_044	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
54	SC-42_045	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYWDF	WGQGLVTVSS
55	SC-42_046	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHFYFDF	WGQGLVTVSS
59	SC-42_047	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYEADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
61	SC-42_048	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
63	SC-42_049	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDI	WGQGLVTVSS
65	SC-42_050	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYEADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
67	SC-42_051	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHFYFDF	WGQGLVTVSS
69	SC-42_052	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AQIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
71	SC-42_053	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDL	WGQGLVTVSS
73	SC-42_054	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYYDF	WGQGLVTVSS
75	SC-42_055	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDL	WGQGLVTVSS
77	SC-42_057	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYYDF	WGQGLVTVSS
79	SC-42_058	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHFYFDF	WGQGLVTVSS
81	SC-42_059	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
83	SC-42_060	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYFDI	WGQGLVTVSS
85	SC-42_061	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYYDF	WGQGLVTVSS
87	SC-42_062	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ADIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
89	SC-42_063	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
91	SC-42_064	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AKIIYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
93	SC-42_065	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYDADYLHWYYDF	WGQGLVTVSS
95	SC-42_066	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYEADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS

Фиг. 1В Продолжение

SEQ ID NO:	Название клона	FR3H	CDR3H	FR4
97	SC-42_067	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYFYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
99	SC-42_068	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIIYYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
101	SC-42_069	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYYDADYLHWYFDL	WGQGLVTVSS
103	SC-42_070	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIYYYDADYLHFIYFDF	WGQGLVTVSS
105	SC-42_071	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRTEDEAVYYC	ASIIYYYDAYYLHWYYDF	WGQGLVTVSS
107	SC-42_072	DYADAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	ASIIYYYDADYLHWYFQF	WGQGLVTVSS
109	SC-42_073	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	ASIIYYYDADYLHWYWDF	WGQGLVTVSS
111	SC-42_075	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	ASIIYYYDADYLHWYFDM	WGQGLVTVSS
113	SC-42_077	DYADAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	AQIIYYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
115	SC-42_079	DYADAVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLRTEDEAVYYC	AKIIYYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
117	SC-42_080	DYNDAVKGRFTISRDNKNTLYLYKMNLSRTEDEAVYYC	ASIIYYYDADYLYWYFDF	WGQGLVTVSS
119	SC-42_081	DYTDAVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLRTEDEAVYYC	ASIIYYYDSDYLYHWYFDF	WGQGLVTVSS
121	SC-42_082	DYTSAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRTEDEAVYYC	ASIIYYYDADYLHWYWDF	WGQGLVTVSS
123	SC-42_083	DYTDAVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLRTEDEAVYYC	ASIIYYYEADYLHWYYDF	WGQGLVTVSS
125	SC-42_084	DYTDAVKGRFTISKDNSKSVFLKMNSLQTDDEAVYYC	ASIIYYYDADYLHWYIDF	WGQGLVTVSS
127	SC-42_085	DYTDAVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLQTEDEAVYYC	ASIIYYYDADYLHWYWDF	WGQGLVTVSS
129	SC-42_088	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTGMYC	ASIIYYYDADYLHWYFDL	WGQGLVTVSS
131	SC-42_089	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	ASIIYYYDADYLHWYWDF	WGQGLVTVSS
133	SC-42_090	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	ASIIYYYDADYLHWYLDL	WGQGLVTVSS
135	SC-42_091	QYADAVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLRAEDTAVYYC	ASIIWYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
137	SC-42_101	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	AQIIYYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
207	SC-42_101R	DYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	AQIIYYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS
139	SC-42_102	QYADAVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTAMYYC	AKIIYYYDADYLHWYFDF	WGQGLVTVSS

Фиг. 1В Продолжение

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

SEQ ID NO:	Название клона	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
2	2166	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLAS	EGISNS	LAWYQLKPGKSPQFLIY	ATS
4	SC-42_006	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATN
6	SC-42_007	EIVMTQSPASLSLSVEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
8	SC-42_008	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNN	VAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
10	SC-42_010	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISSS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
12	SC-42_011	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGINNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATQ
14	SC-42_023	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
16	SC-42_024	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
18	SC-42_025	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
20	SC-42_026	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
22	SC-42_027	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
24	SC-42_028	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
26	SC-42_029	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
28	SC-42_030	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
30	SC-42_031	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
32	SC-42_032	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
34	SC-42_033	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
36	SC-42_034	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
38	SC-42_035	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
40	SC-42_036	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
42	SC-42_037	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
44	SC-42_038	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
46	SC-42_040	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
48	SC-42_041	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS

Фиг. 2А

SEQ ID NO:	Название клона	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
50	SC-42_042	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
52	SC-42_043	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
54	SC-42_044	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
56	SC-42_045	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
58	SC-42_046	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
60	SC-42_047	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
62	SC-42_048	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
64	SC-42_049	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
66	SC-42_050	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
68	SC-42_051	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
70	SC-42_052	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
72	SC-42_053	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
74	SC-42_054	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
76	SC-42_055	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
78	SC-42_057	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
80	SC-42_058	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
82	SC-42_059	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
84	SC-42_060	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
86	SC-42_061	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
88	SC-42_062	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
90	SC-42_063	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
92	SC-42_064	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
94	SC-42_065	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
96	SC-42_066	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS

Фиг. 2А Продолжение

SEQ ID NO:	Название клона	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
98	SC-42_067	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
100	SC-42_068	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
102	SC-42_069	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
104	SC-42_070	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
106	SC-42_071	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
108	SC-42_072	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	AAS
110	SC-42_073	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGIQNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATN
112	SC-42_075	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNA	LAWYQQKPGKAPKLLIY	ATE
114	SC-42_077	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATE
116	SC-42_079	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGIGNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
118	SC-42_080	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	DGISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATQ
120	SC-42_081	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EAISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ASS
122	SC-42_082	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNG	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
124	SC-42_083	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISSS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATA
126	SC-42_084	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
128	SC-42_085	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	DGISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
130	SC-42_088	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EAISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATT
132	SC-42_089	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	KGISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
134	SC-42_090	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNT	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATE
136	SC-42_091	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	ENISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
138	SC-42_101	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIH	ATS
140	SC-42_102	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS

Фиг. 2А Продолжение

SEQ ID NO:	Название клона	FR3L	CDR3L	FR4L
2	2166	SLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGVYYC	QQGYKFPLT	FGSGTKLKIK
4	SC-42_006	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
6	SC-42_007	SLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGWFPLT	FGQGTKVEIK
8	SC-42_008	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKFPMT	FGQGTKVEIK
10	SC-42_010	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
12	SC-42_011	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVAVYYC	QQGFKFPLT	FGQGTKVEIK
14	SC-42_023	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
16	SC-42_024	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
18	SC-42_025	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
20	SC-42_026	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
22	SC-42_027	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
24	SC-42_028	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
26	SC-42_029	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
28	SC-42_030	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
30	SC-42_031	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
32	SC-42_032	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
34	SC-42_033	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
36	SC-42_034	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
38	SC-42_035	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
40	SC-42_036	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
42	SC-42_037	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
44	SC-42_038	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
46	SC-42_040	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
48	SC-42_041	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK

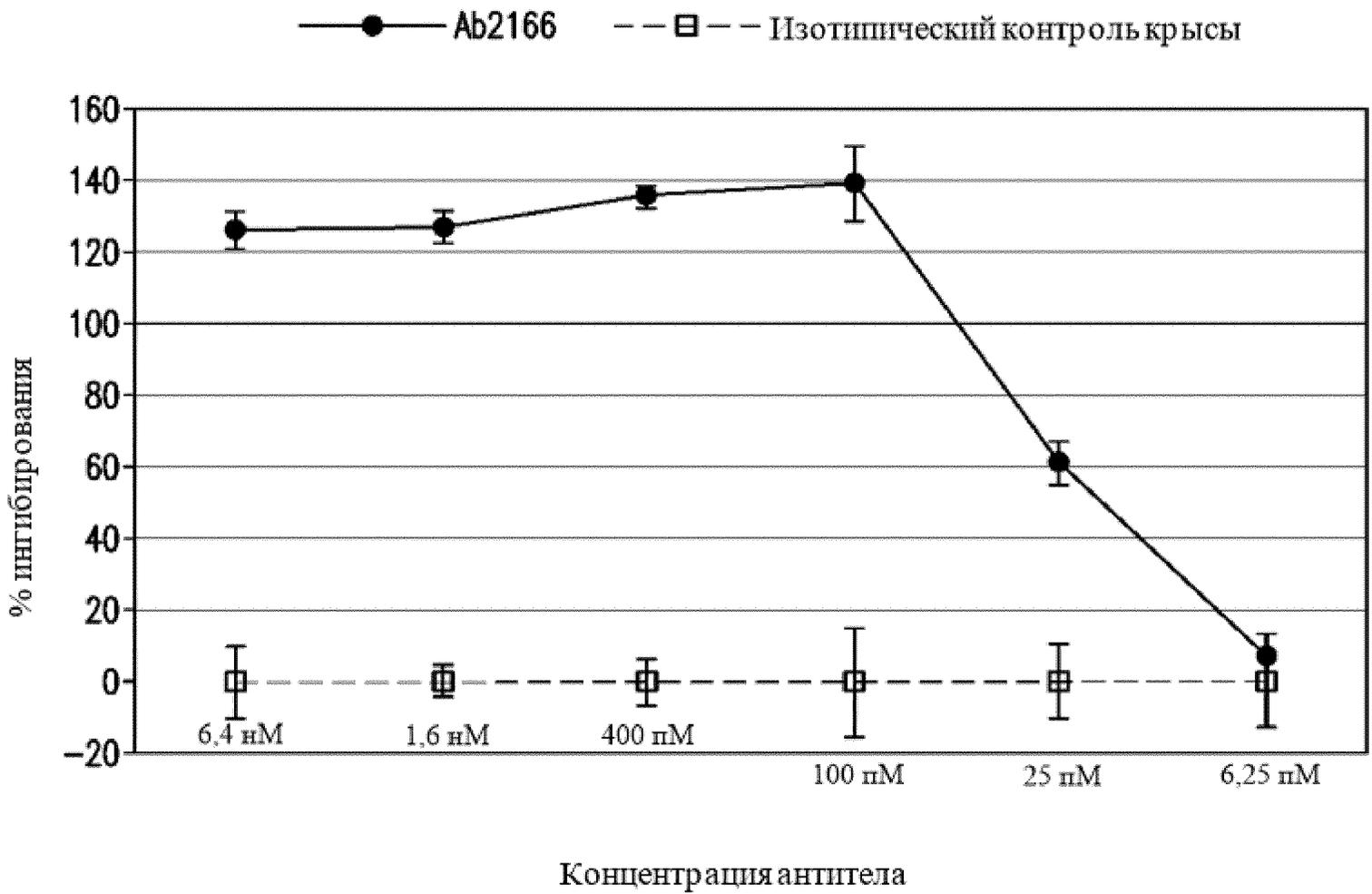
Фиг. 2В

SEQ ID NO:	Название клона	FR3L	CDR3L	FR4L
50	SC-42_042	QLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
52	SC-42_043	QLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
54	SC-42_044	QLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
56	SC-42_045	QLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
58	SC-42_046	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
60	SC-42_047	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
62	SC-42_048	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
64	SC-42_049	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
66	SC-42_050	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
68	SC-42_051	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
70	SC-42_052	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
72	SC-42_053	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
74	SC-42_054	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
76	SC-42_055	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
78	SC-42_057	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
80	SC-42_058	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
82	SC-42_059	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
84	SC-42_060	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
86	SC-42_061	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
88	SC-42_062	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
90	SC-42_063	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
92	SC-42_064	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
94	SC-42_065	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
96	SC-42_066	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK

Фиг. 2В Продолжение

SEQ ID NO:	Название клона	FR3L	CDR3L	FR4L
98	SC-42_067	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
100	SC-42_068	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
102	SC-42_069	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
104	SC-42_070	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
106	SC-42_071	SMATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGAGTKVELK
108	SC-42_072	SLQTGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QHGYKFPLT	FGAGTKVELK
110	SC-42_073	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGHKFPLT	FGAGTKVELK
112	SC-42_075	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGFKFPLT	FGAGTKVELK
114	SC-42_077	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
116	SC-42_079	QLATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGHKFPLT	FGQGTKVEIK
118	SC-42_080	SLARGVPSRFRSGSGSGTDFSFLTISLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGAGTKVELK
120	SC-42_081	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGWFPLT	FGAGTKVELK
122	SC-42_082	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
124	SC-42_083	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
126	SC-42_084	KLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
128	SC-42_085	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
130	SC-42_088	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
132	SC-42_089	ELATGVPSRFRSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
134	SC-42_090	SLATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGFKFPLT	FGQGTKVEIK
136	SC-42_091	TLATGVPSRFRSGSGSGTDFSFLTISLQPEDVATYYC	QQGFKFPLT	FGQGTKVEIK
138	SC-42_101	SLQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGYQFPLT	FGQGTKVEIK
140	SC-42_102	ALATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK

Фиг. 2В Продолжение



Фиг. 3

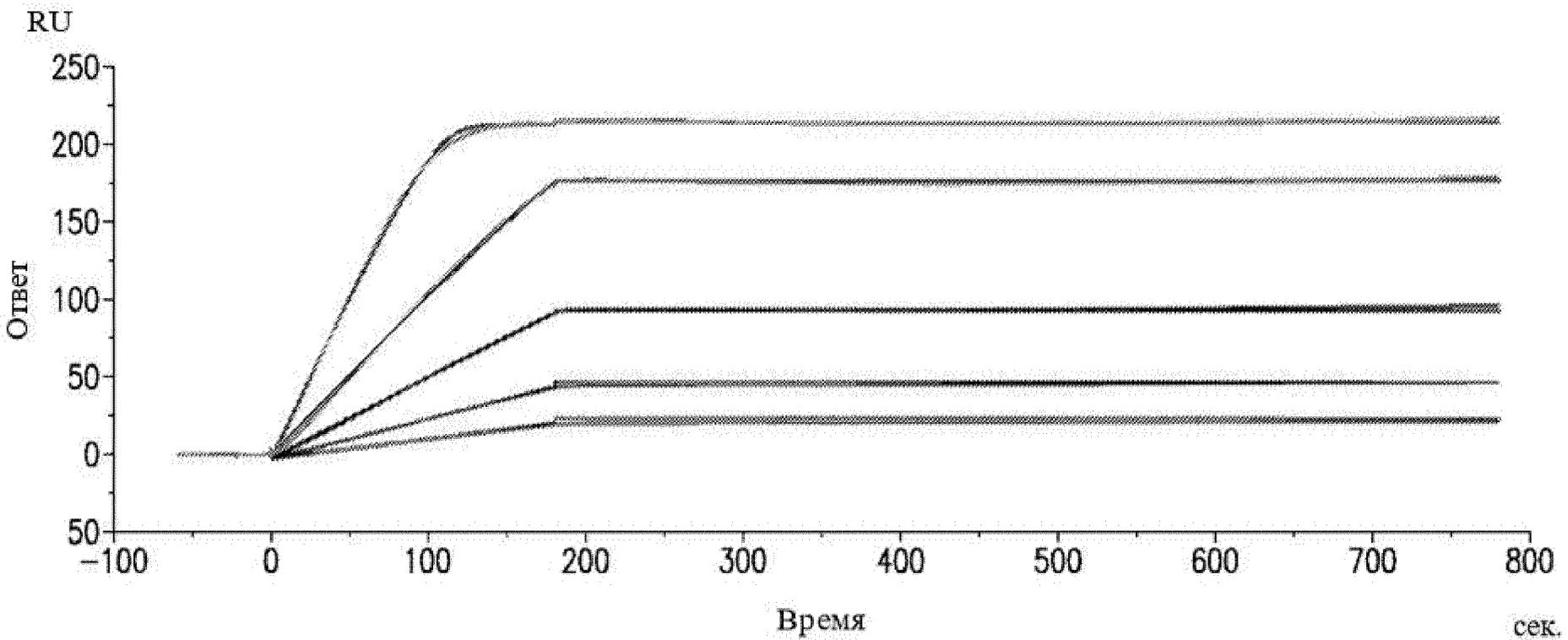
Тяжелая цепь

QVQLKESGPGLVQPSQTL~~SLTCTV~~SGLSLT~~SN~~SV~~SWIR~~QPPGK~~GLEW~~MGVI~~WSNG~~GTDYNSA~~IESRLS~~INRDT~~SKSQ~~
VFLKMNSLQPEDTAMYFCASIIYYDADYLHWYFDFWGPGTMVT~~VSSASTT~~APSVF~~PLAP~~SCGSTSGST~~VALACL~~VSG
YFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPR
PPDCPKCPAPEAAGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFDGKQMOTAKTQPREEQFNGT
YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPD
IDVEWQSNQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPG

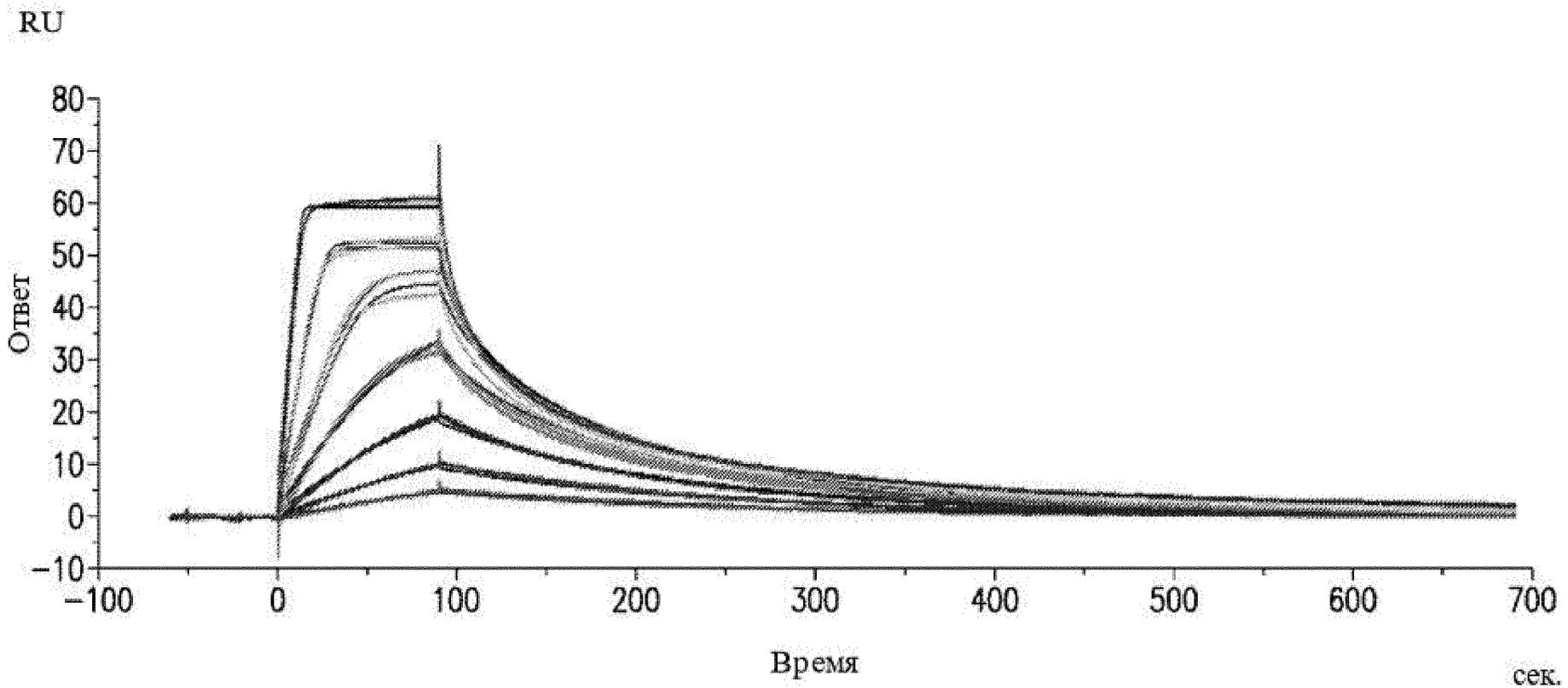
Легкая цепь

DIQMTQSPASLSASLGGETVSI~~ECLASE~~GISNSLAWY~~Q~~LKPGK~~SPQFLIYATSSL~~Q~~DGVPSR~~FSGSGSGTQYSLKISG
MQPEDEGVYYCQQGYKEPLTFGSGTKL~~KIKR~~NDQPAVYLFQ~~PSDQLHT~~GSASV~~VCLL~~NSFY~~PKDIN~~VKWKVDGV
IQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD~~~~

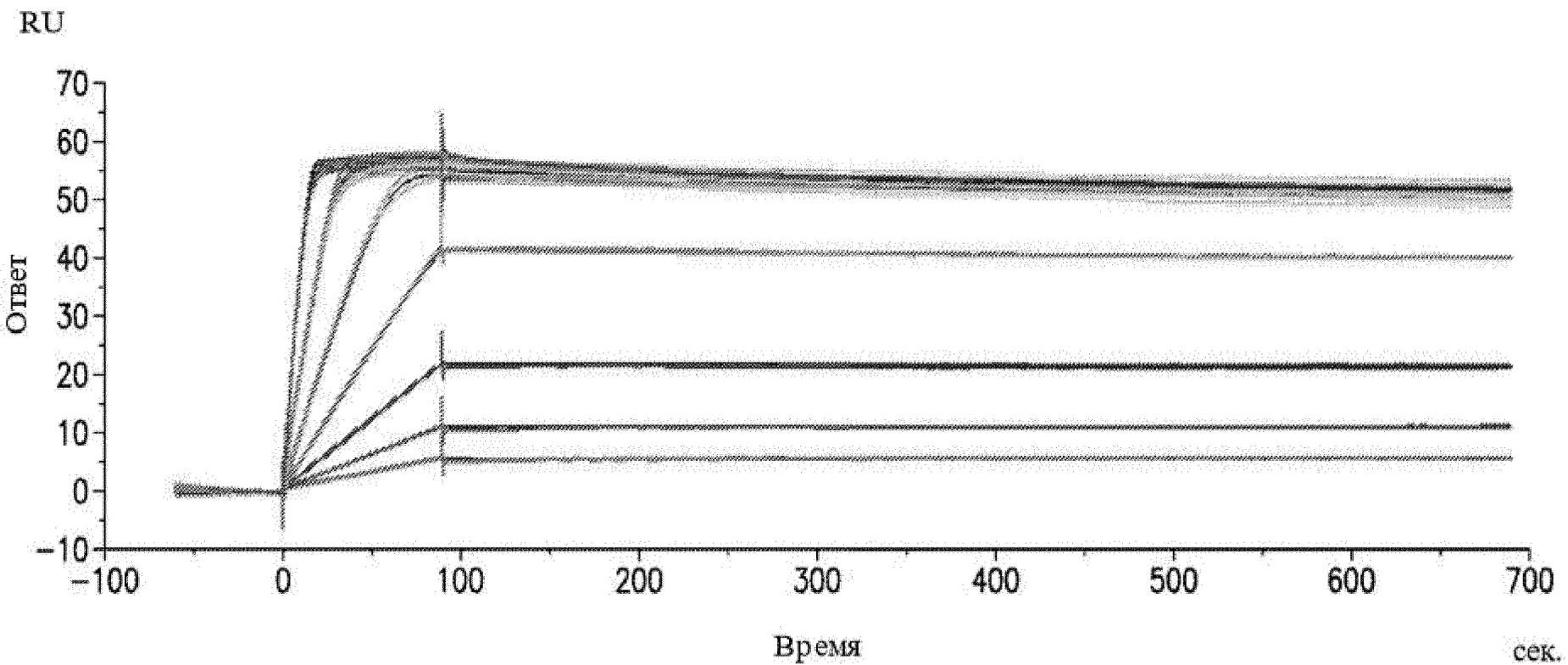
Фиг. 4



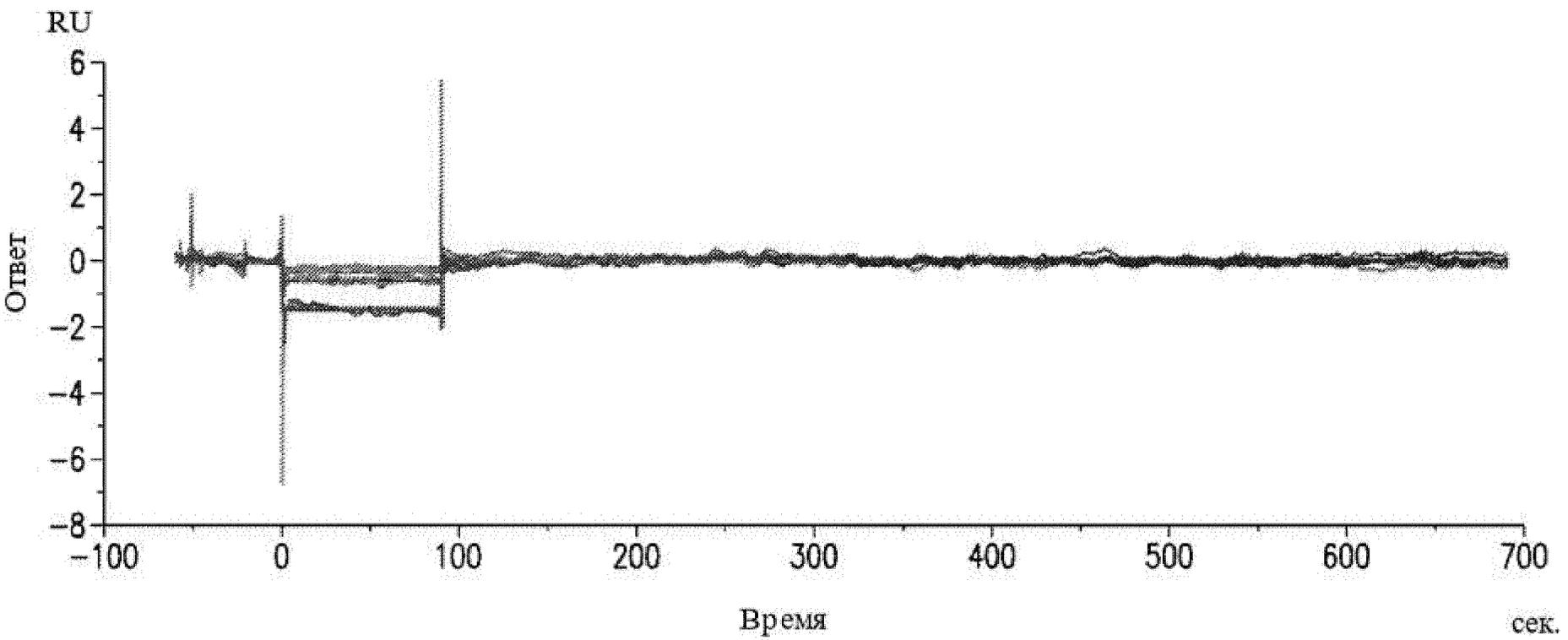
Фиг. 5



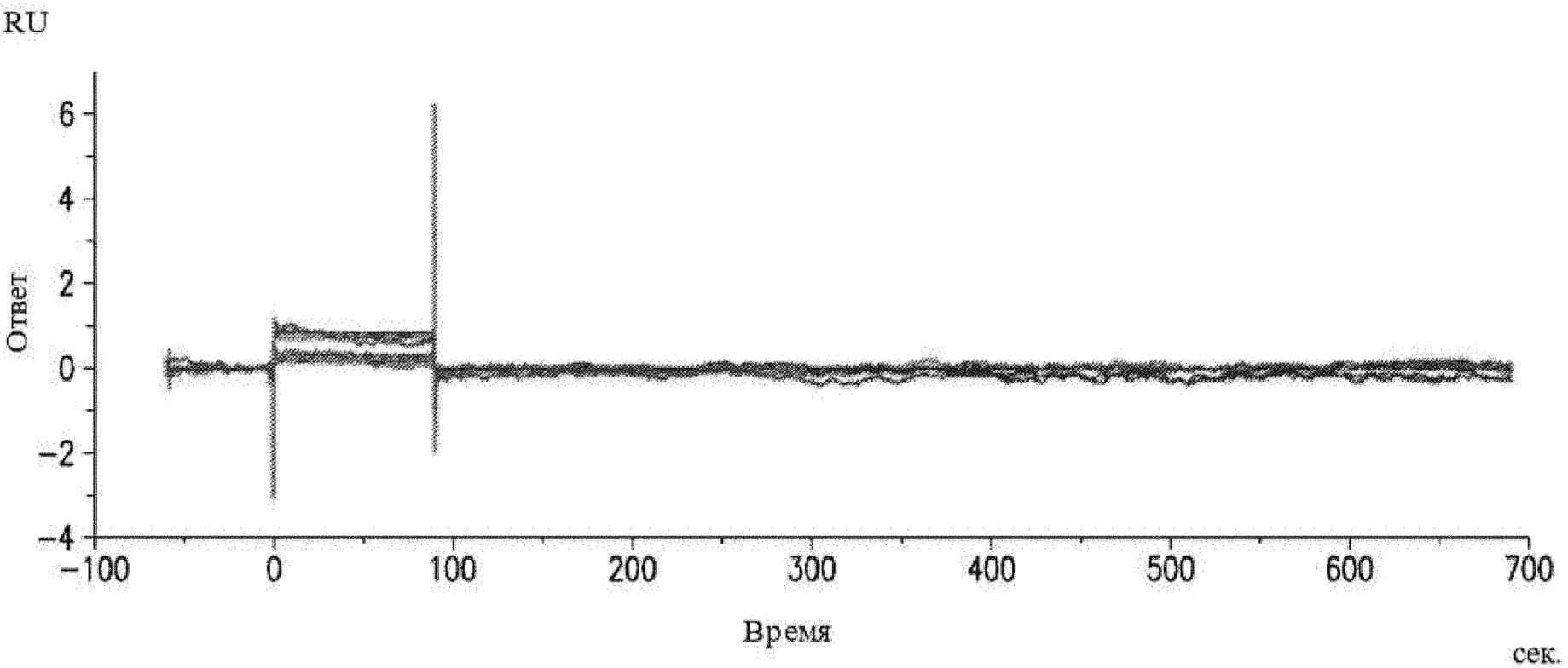
Фиг. 6



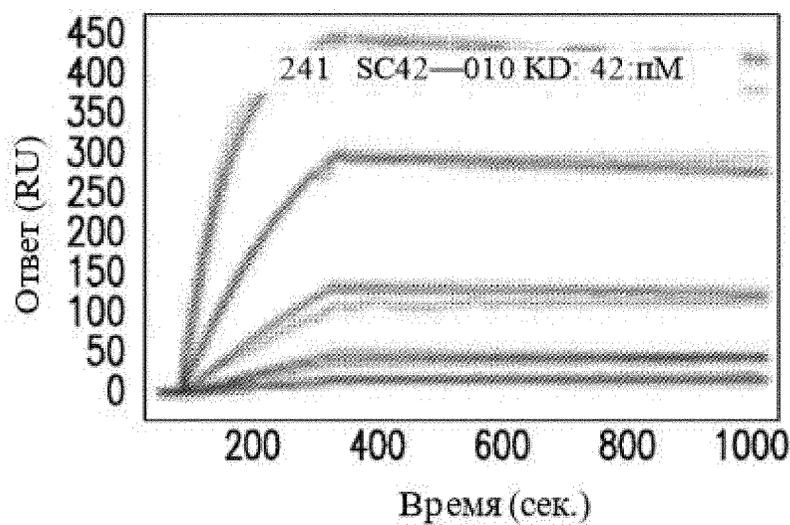
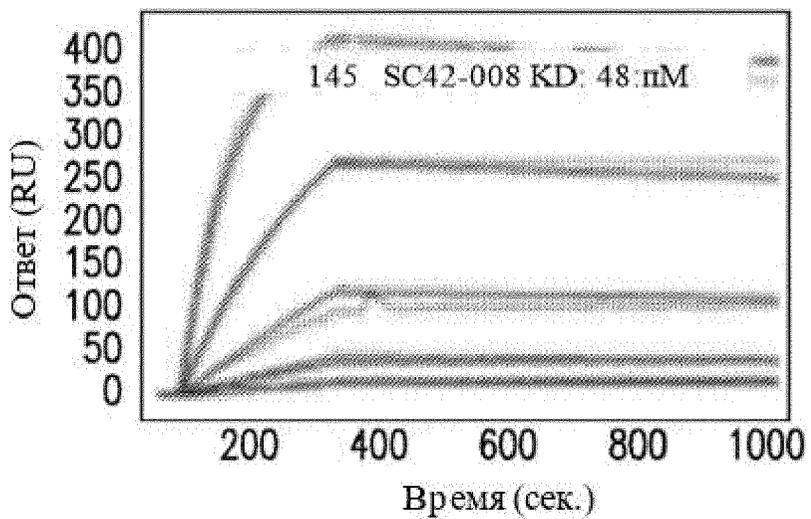
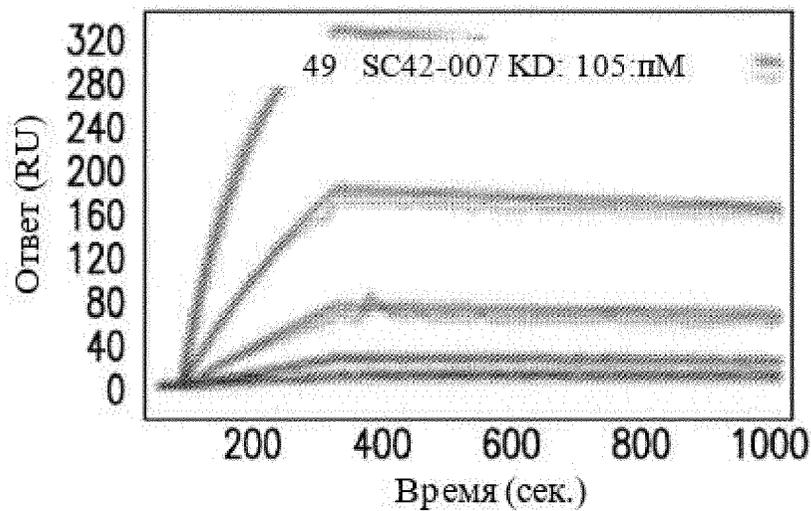
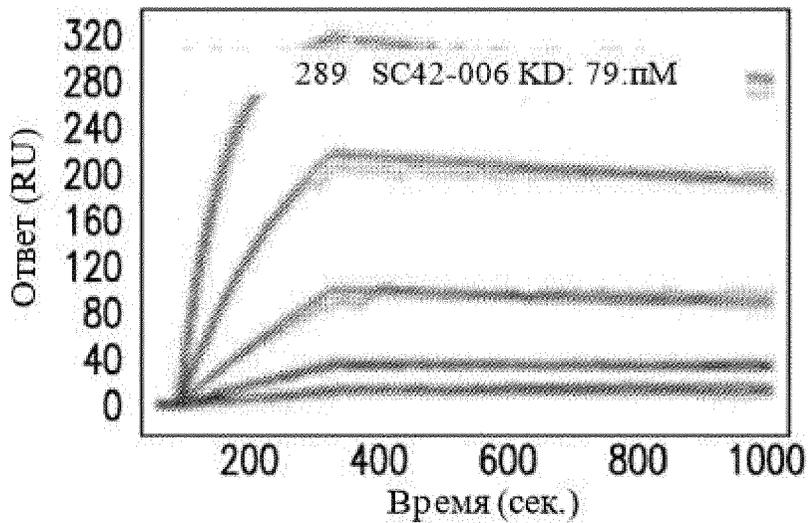
Фиг. 7



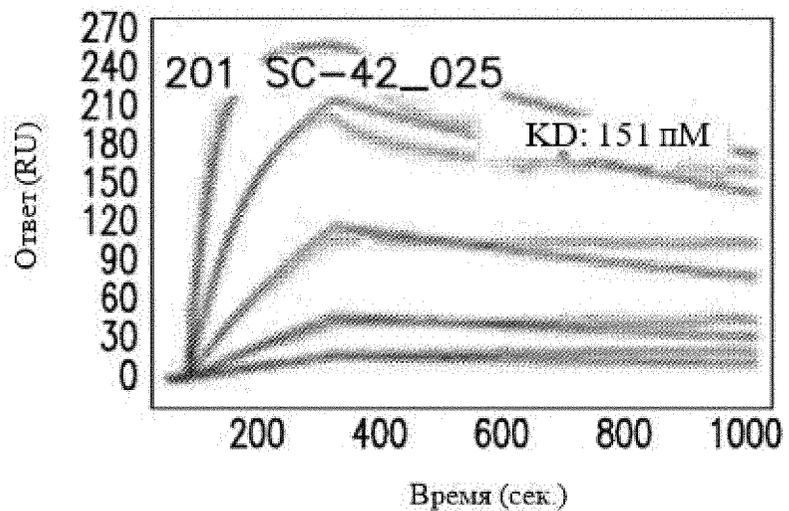
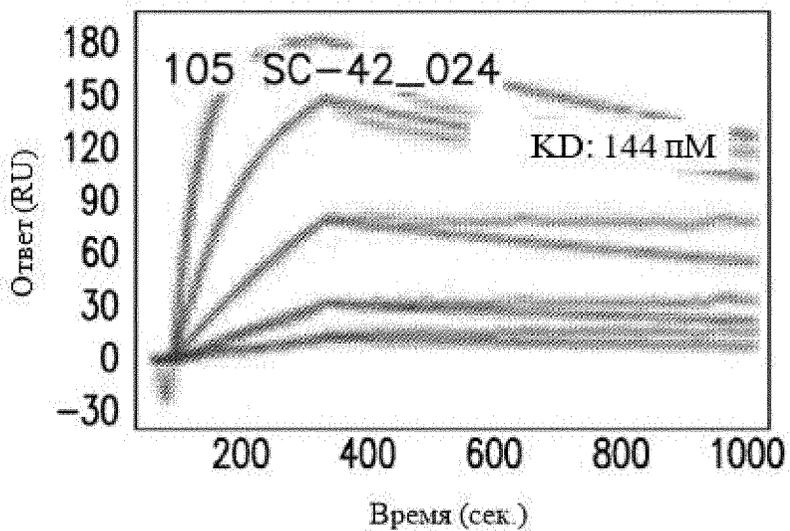
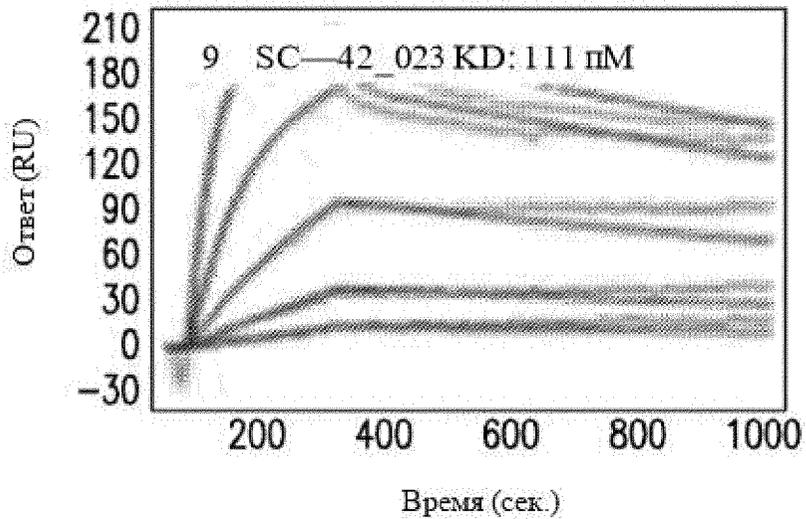
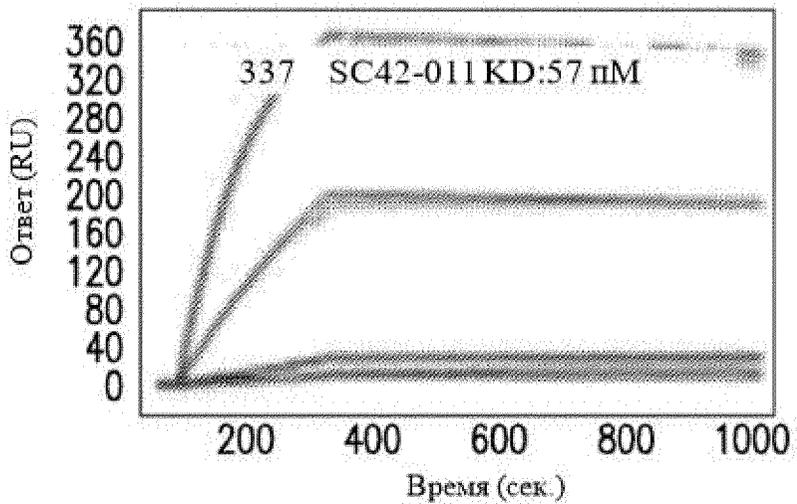
ФИГ. 8



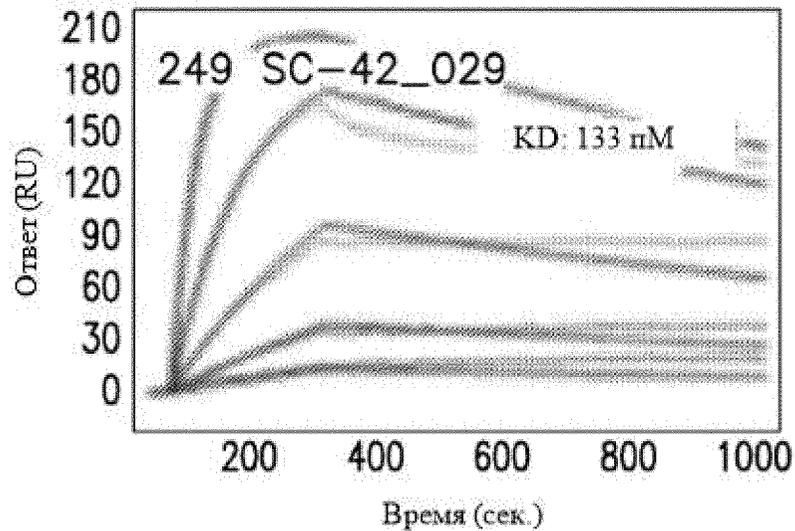
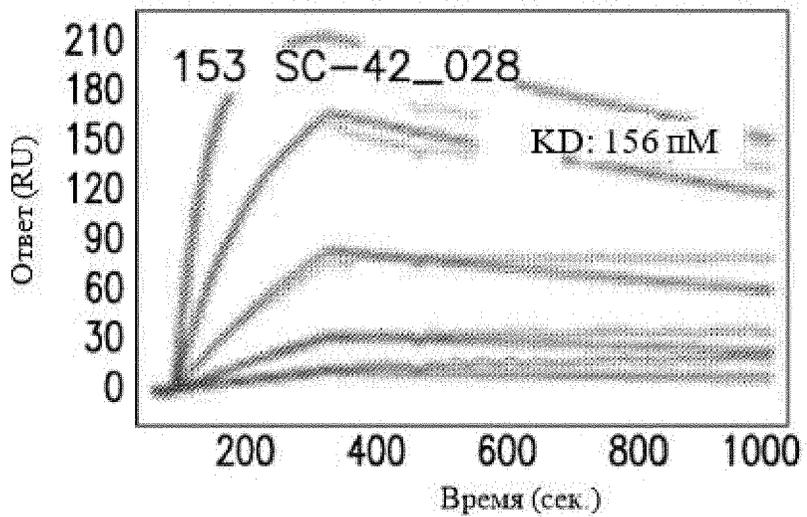
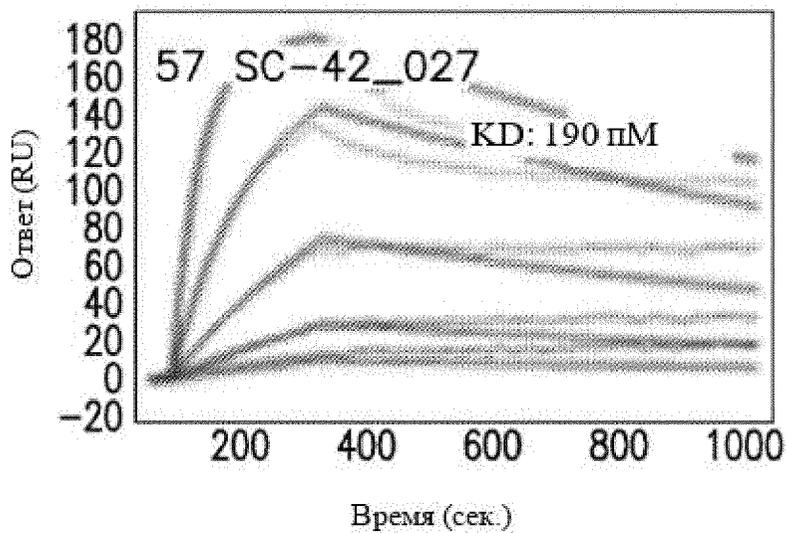
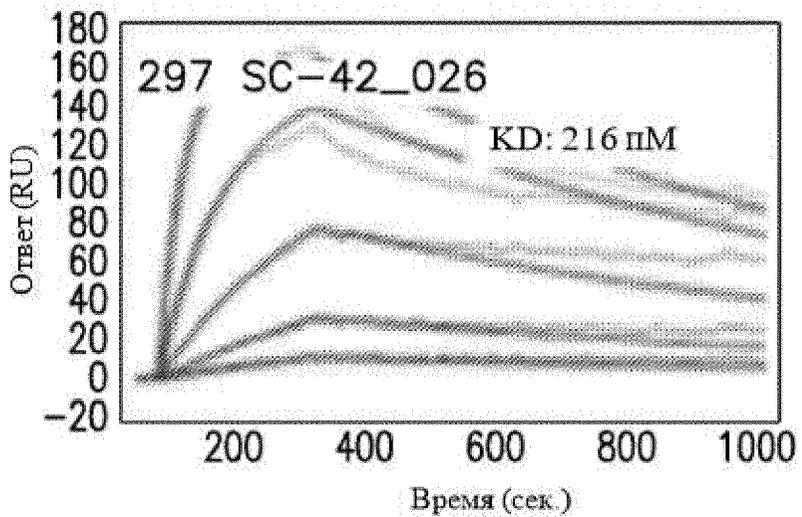
ФИГ. 9



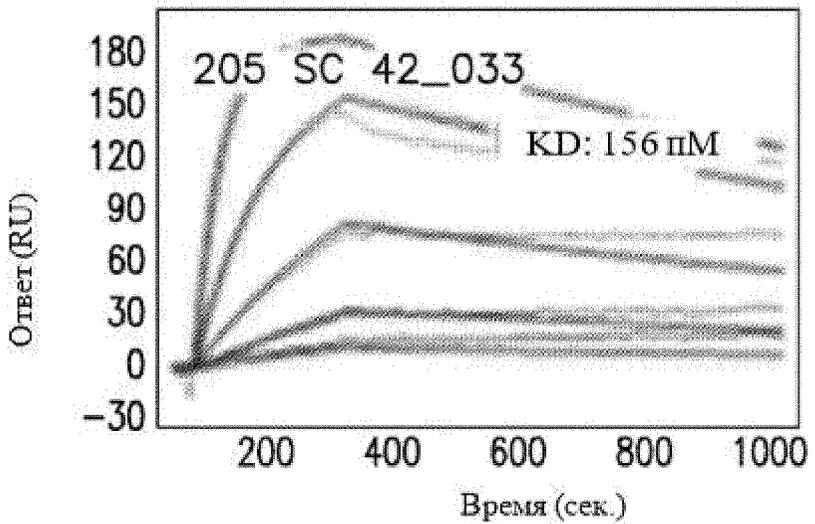
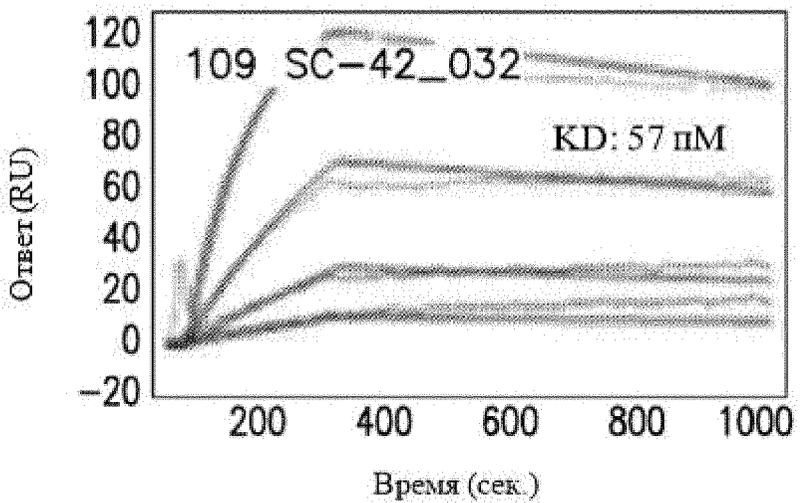
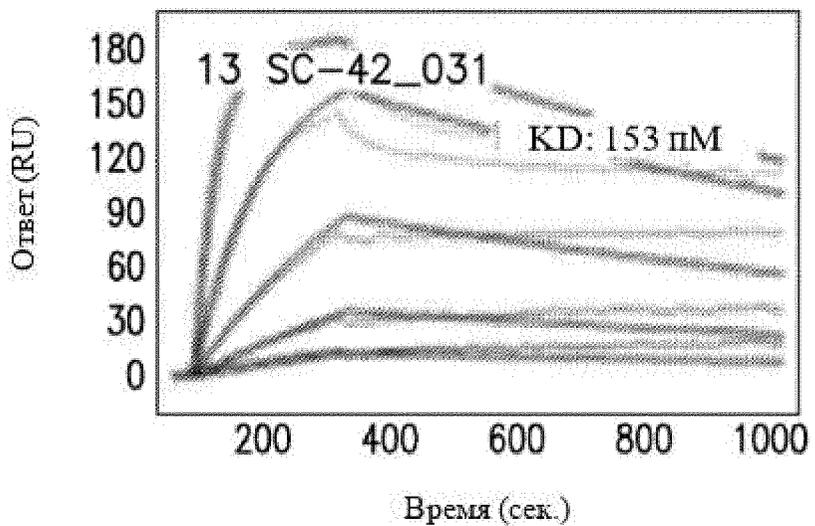
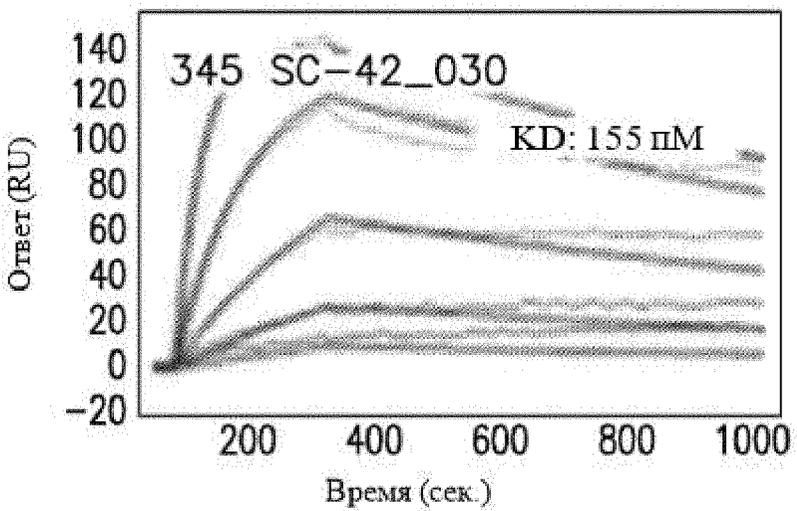
Фиг. 10



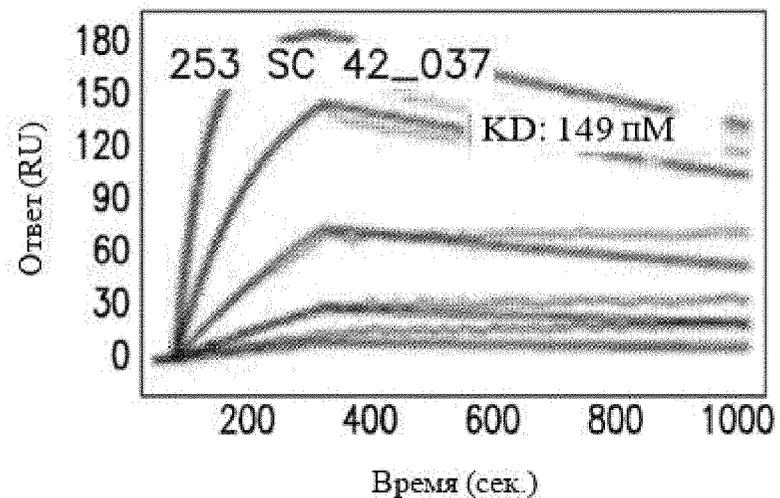
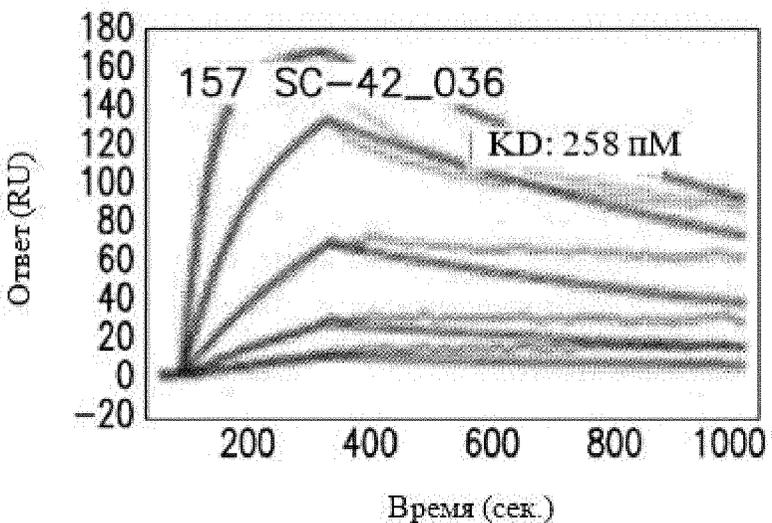
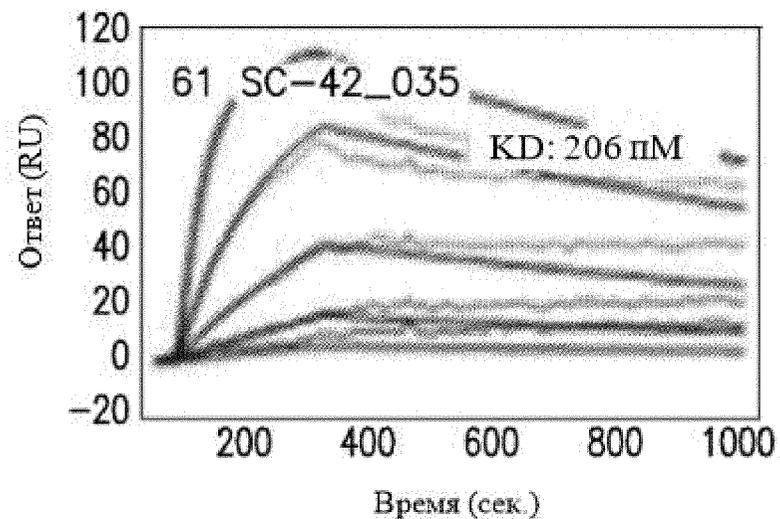
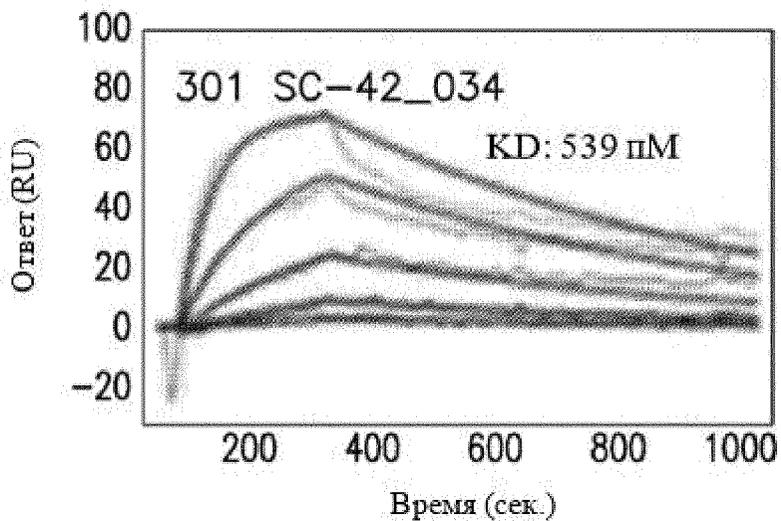
Фиг. 10 Продолжение



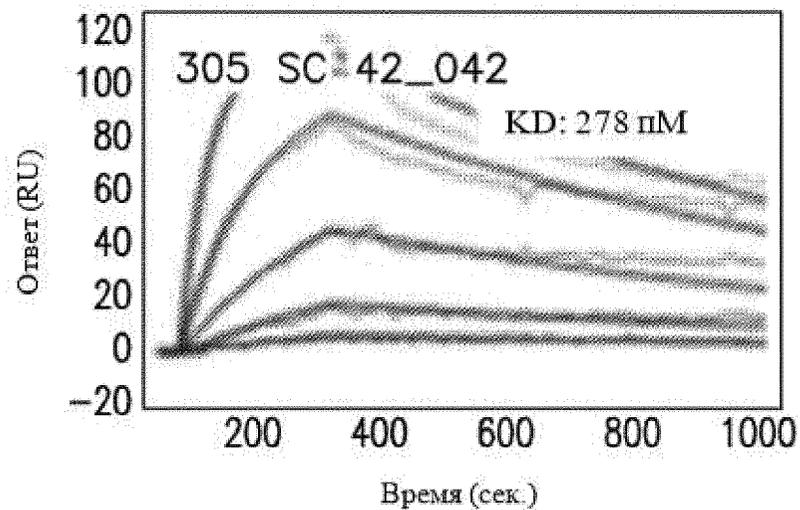
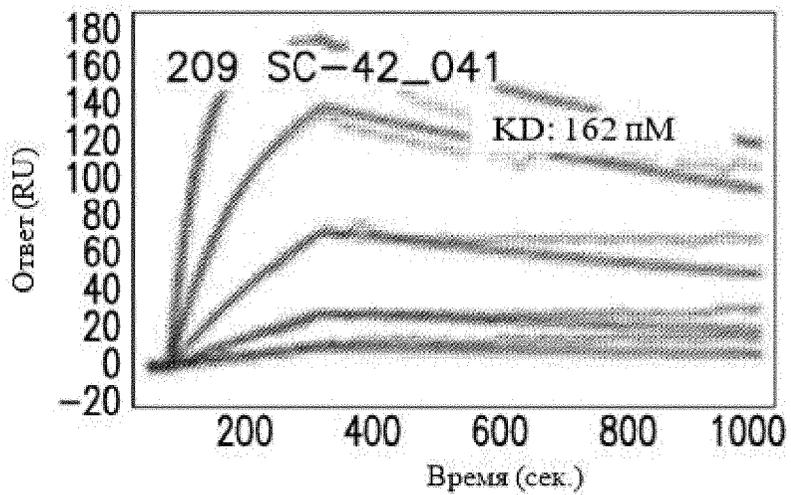
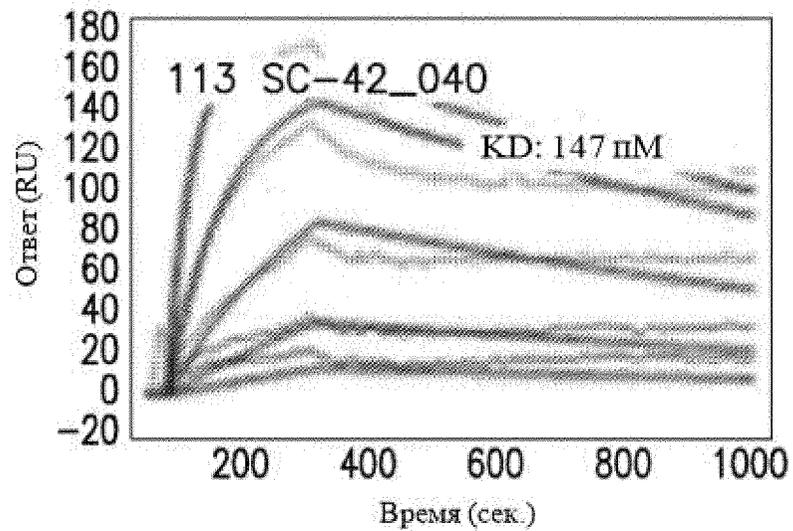
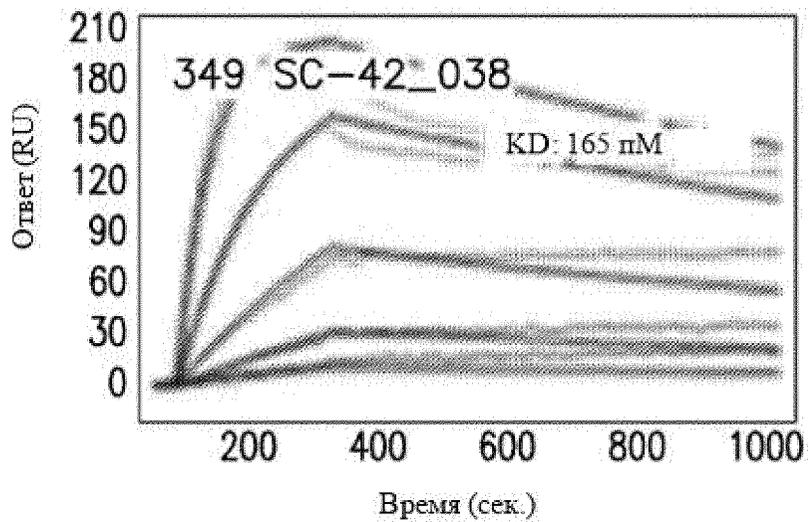
Фиг. 10 Продолжение



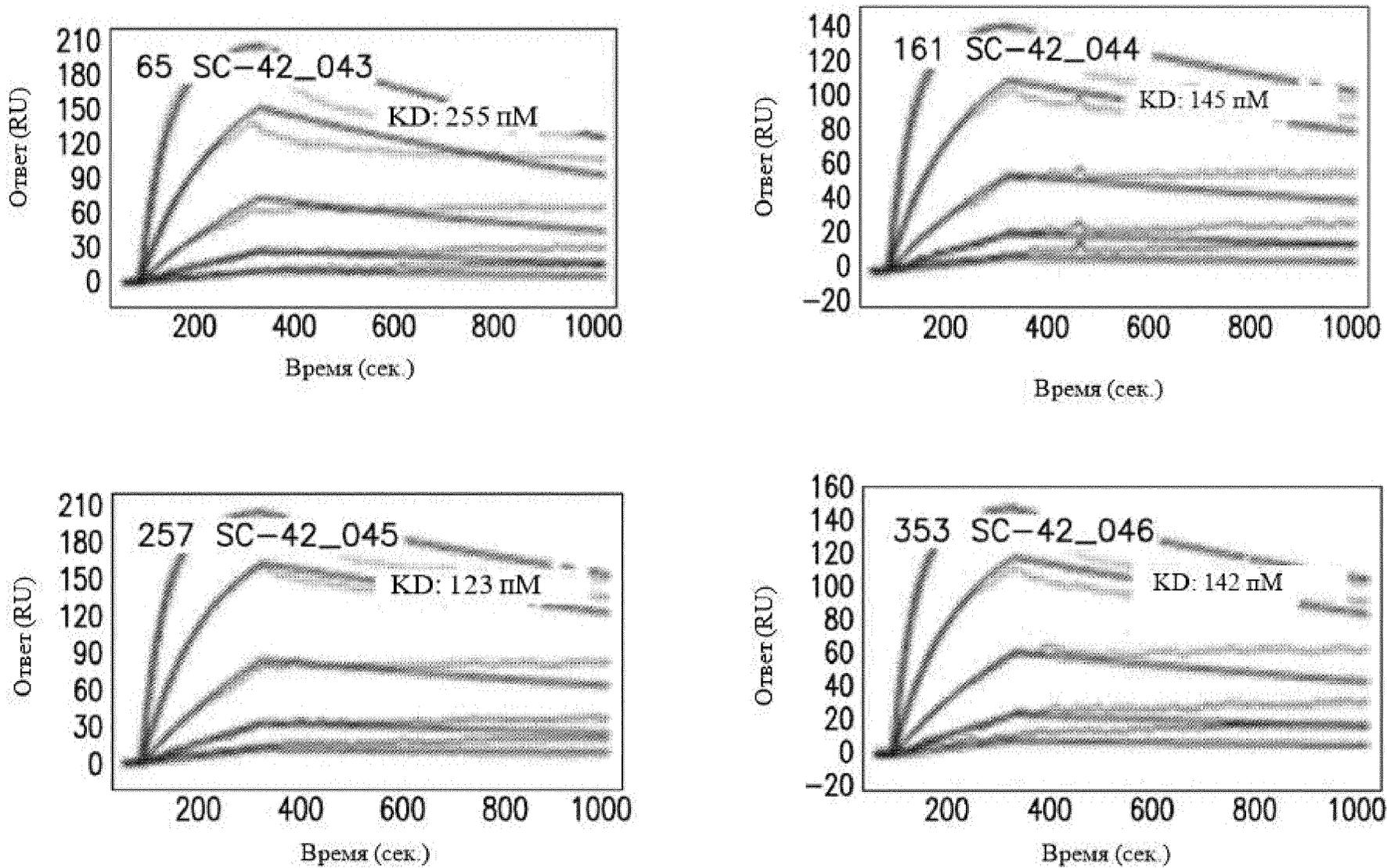
Фиг. 10 Продолжение



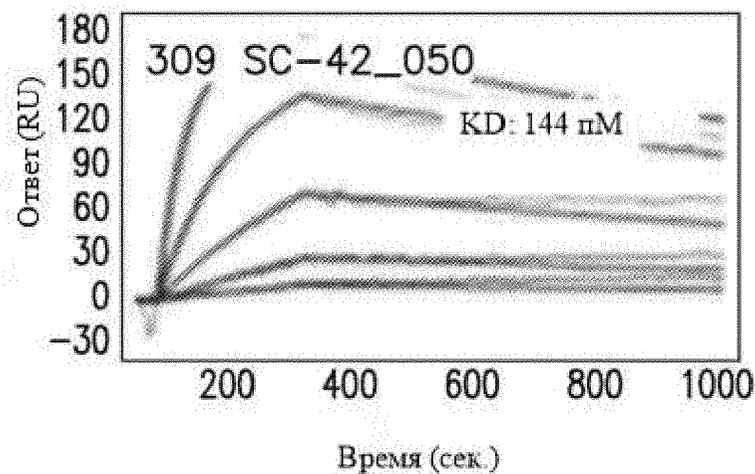
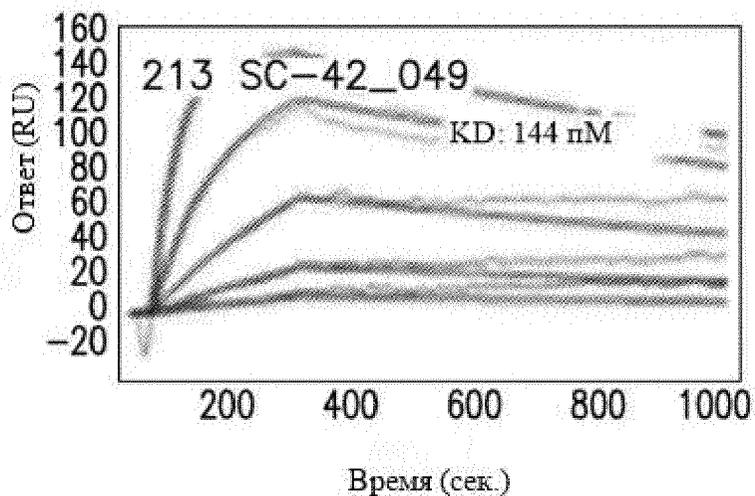
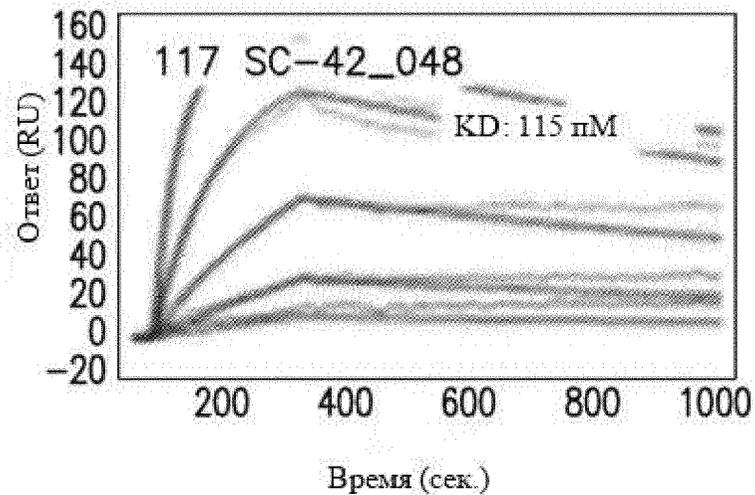
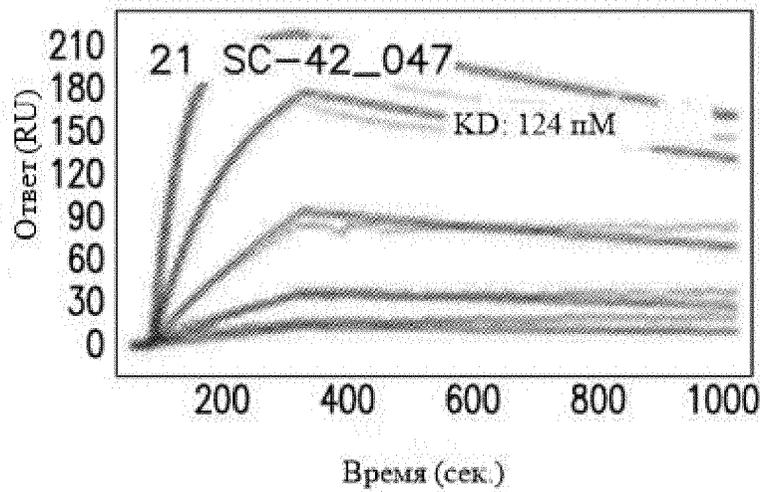
Фиг. 10 Продолжение



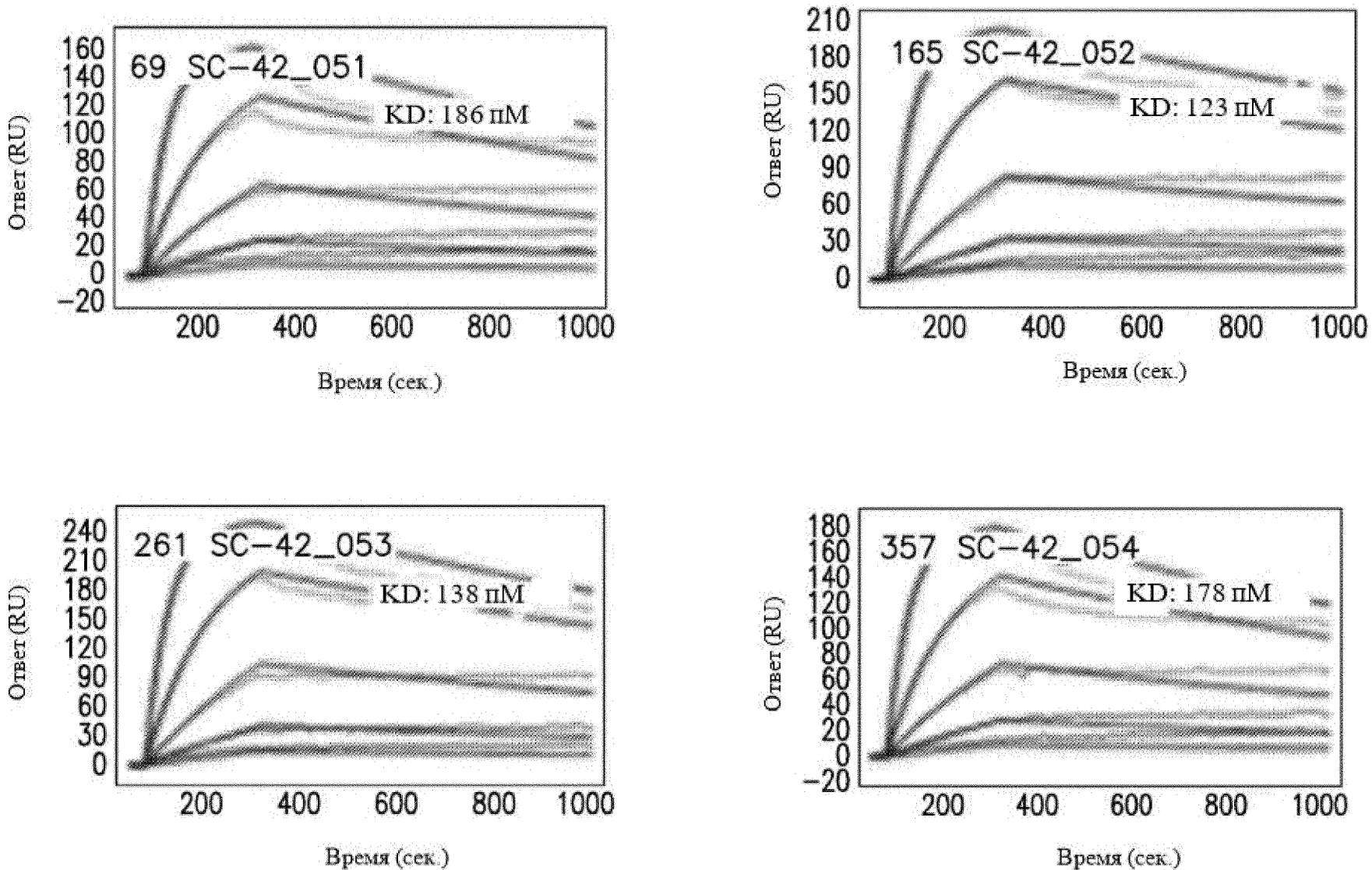
Фиг. 10 Продолжение



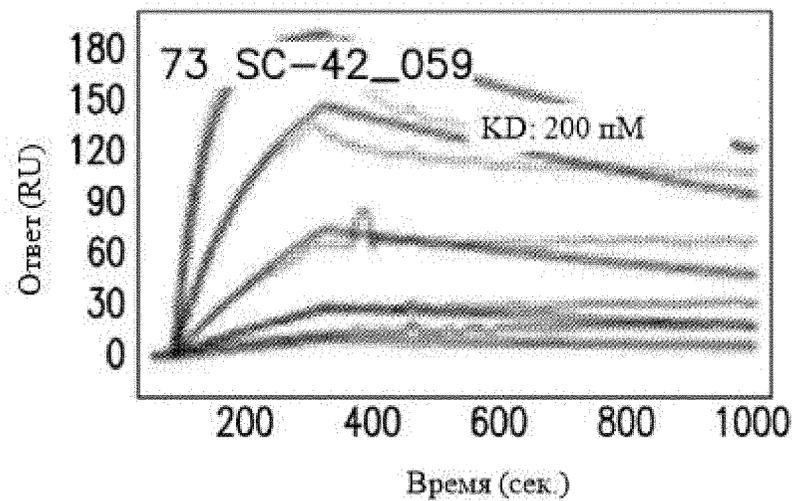
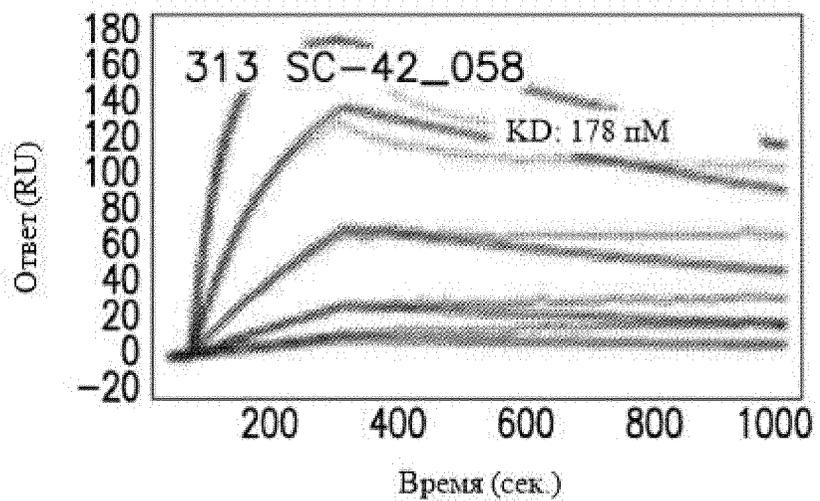
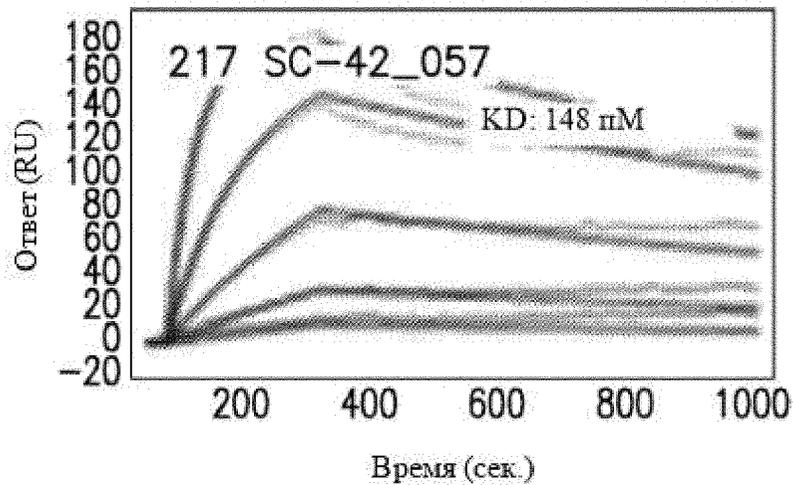
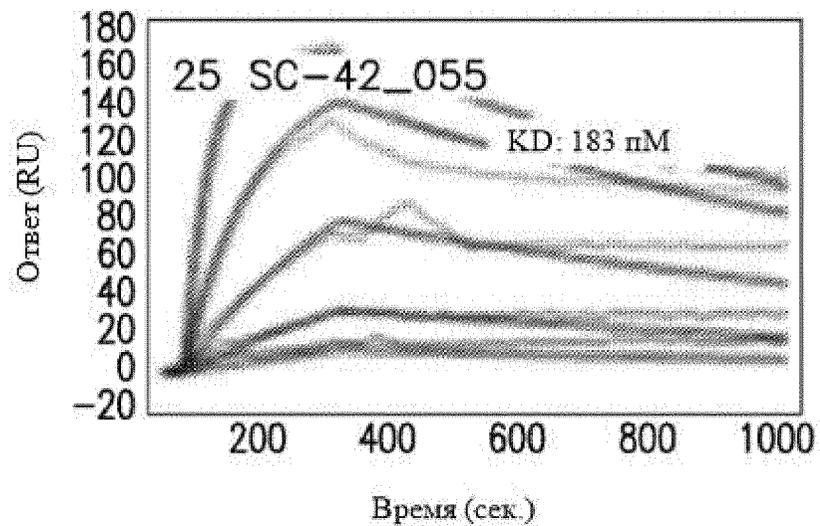
Фиг. 10 Продолжение



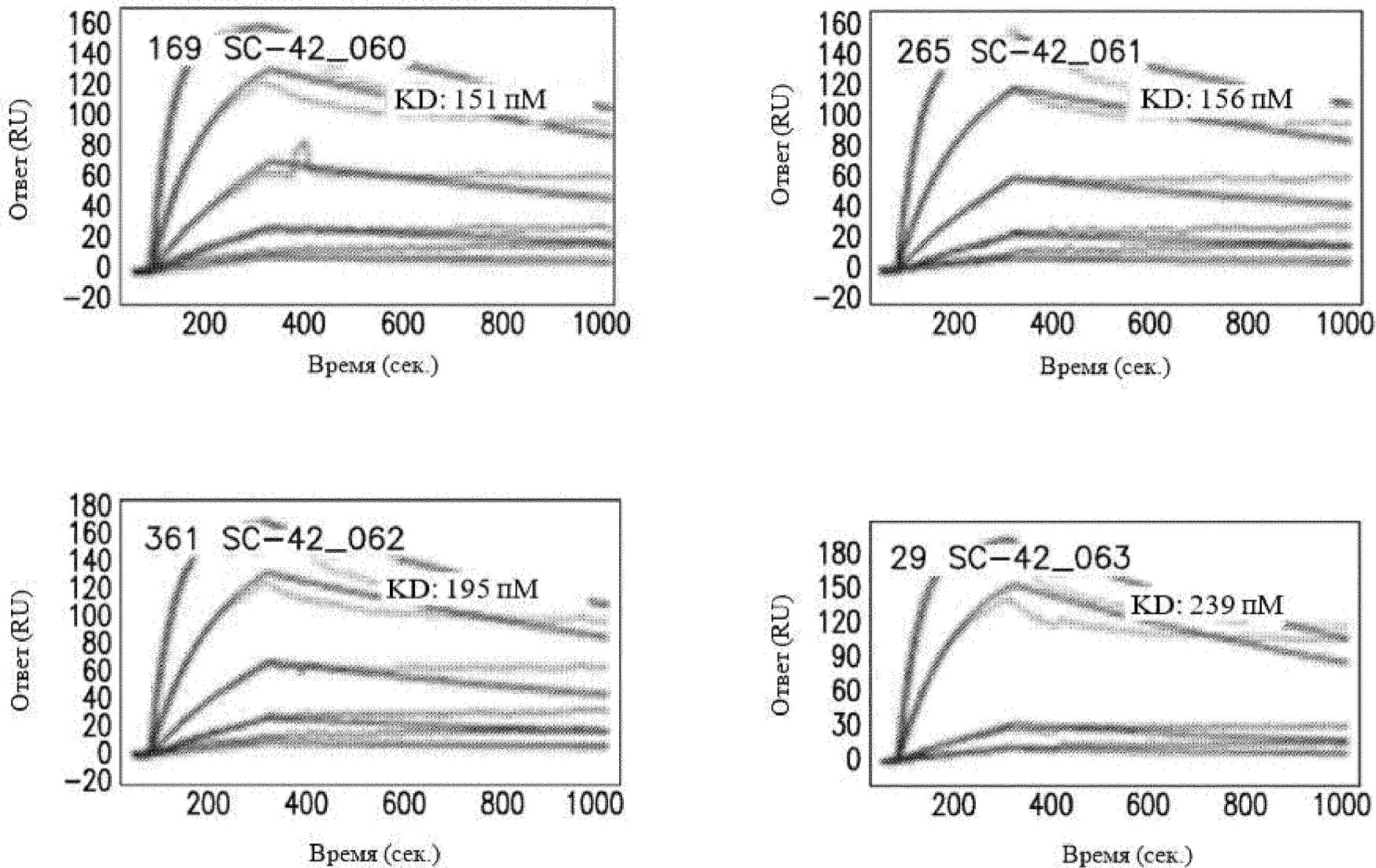
Фиг. 10 Продолжение



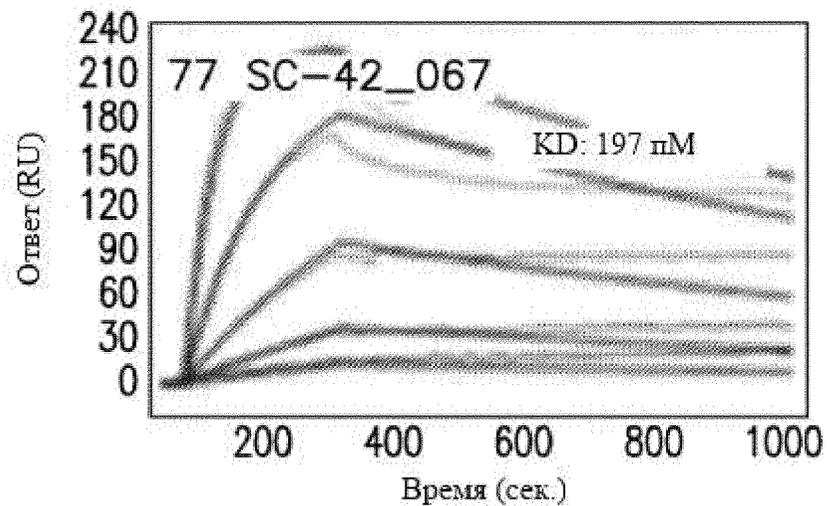
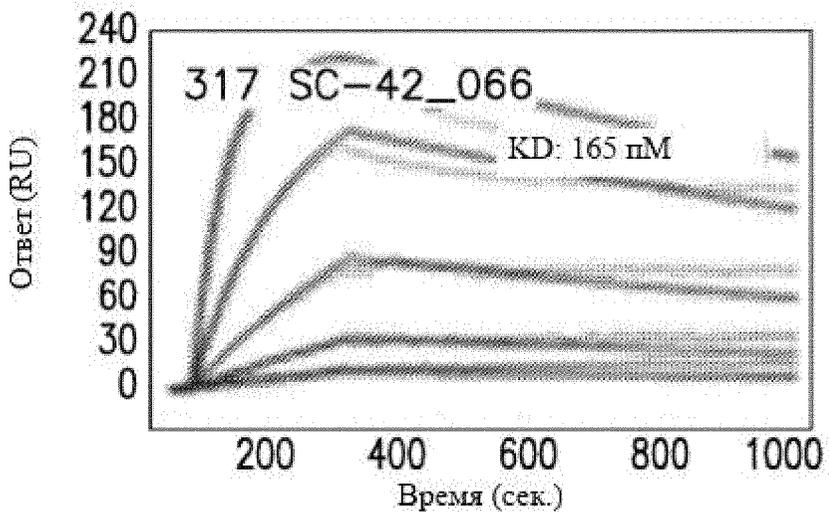
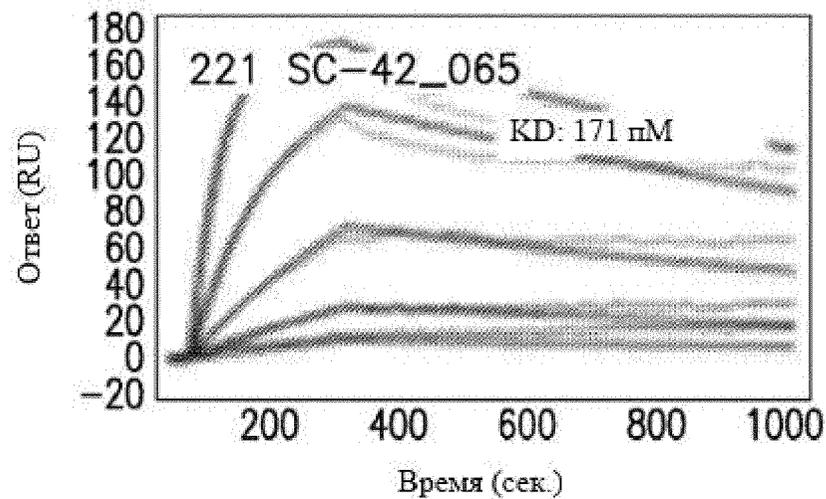
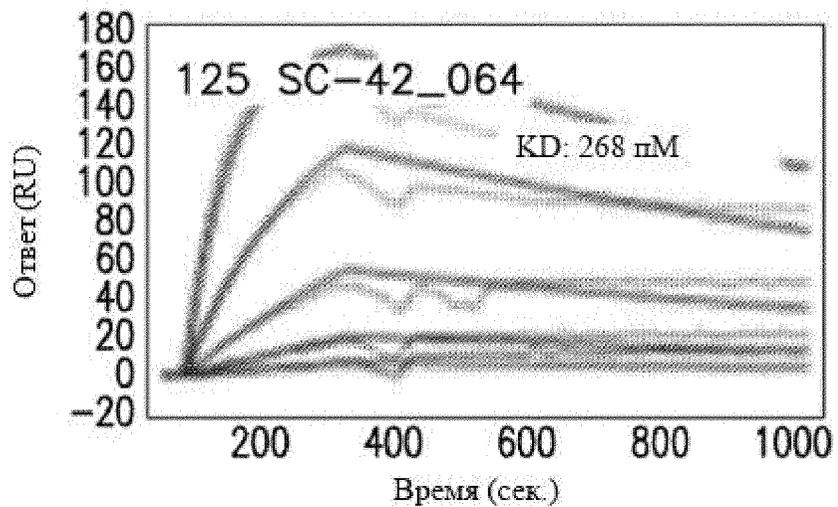
Фиг. 10 Продолжение



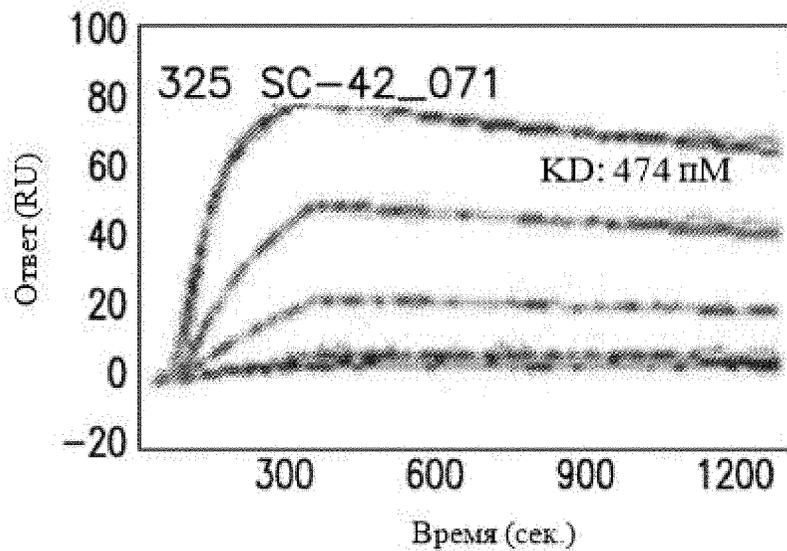
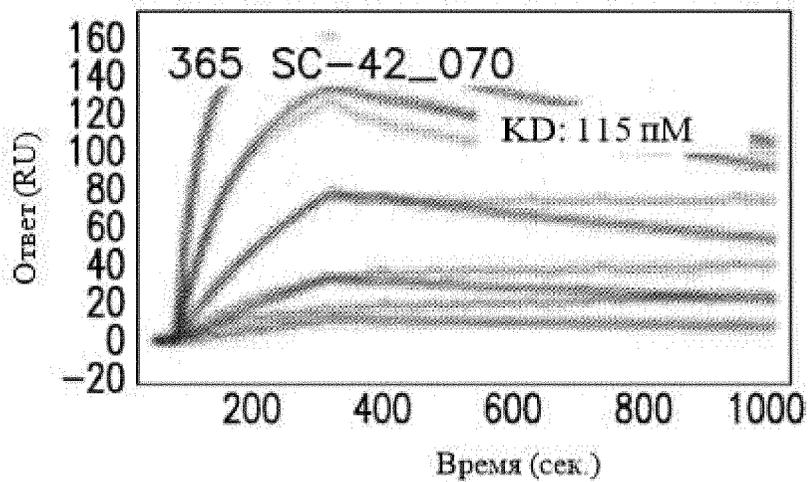
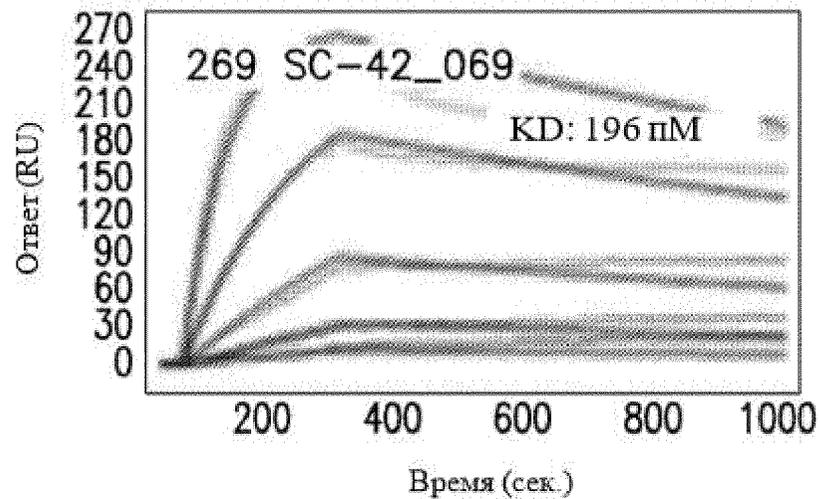
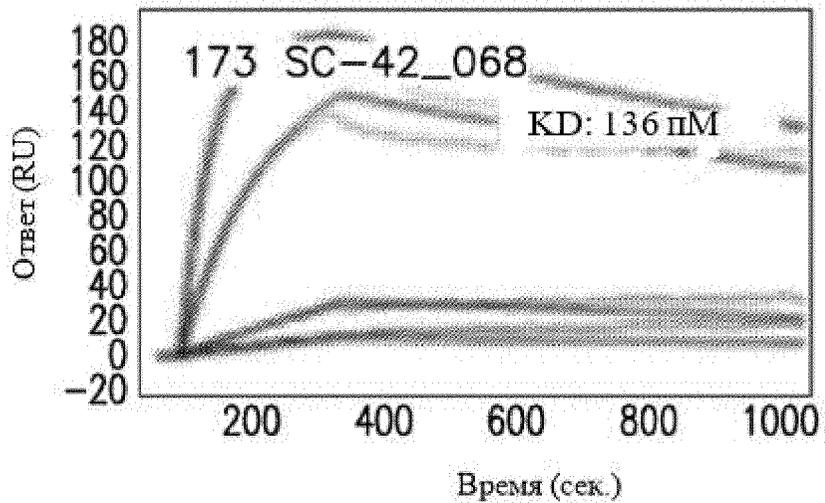
Фиг. 10 Продолжение



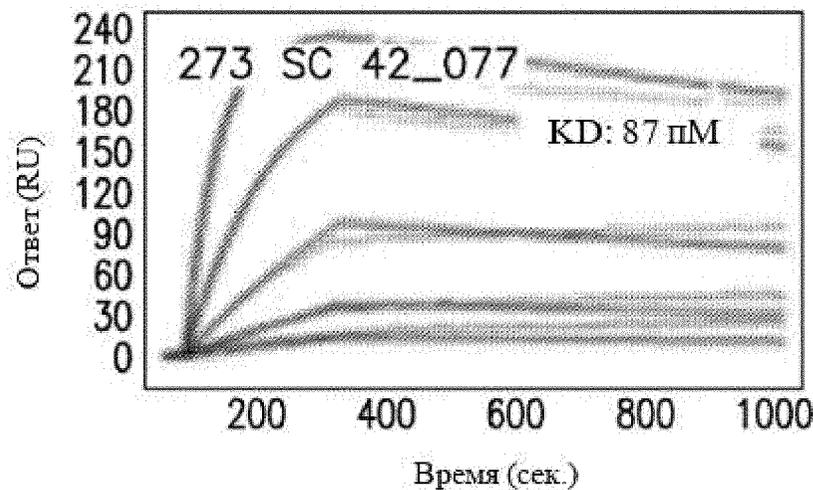
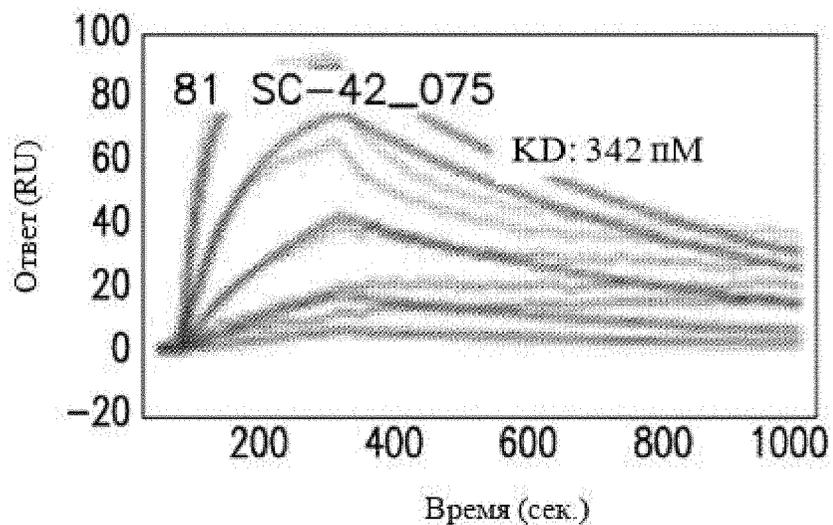
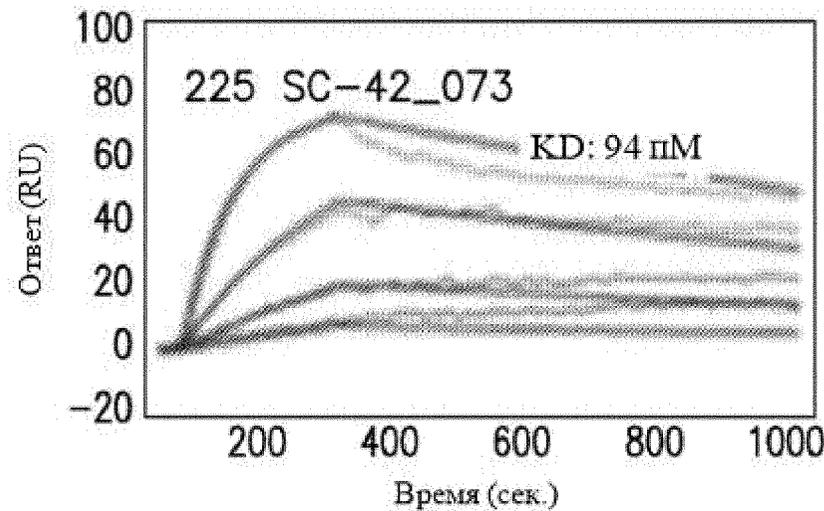
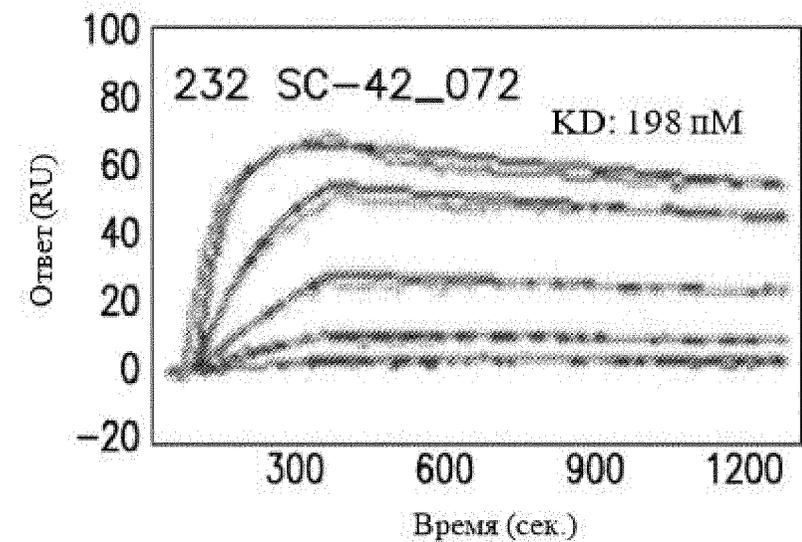
Фиг. 10 Продолжение



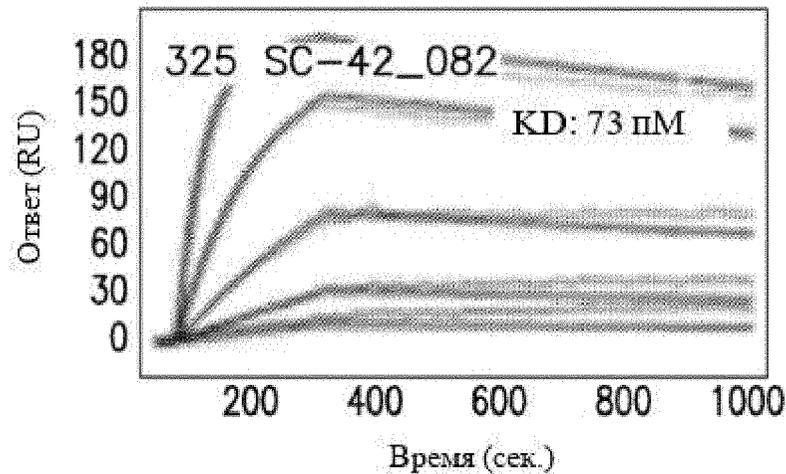
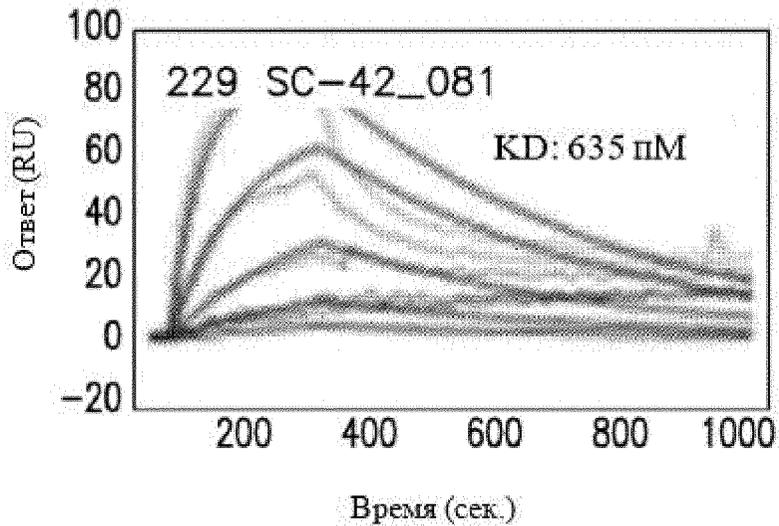
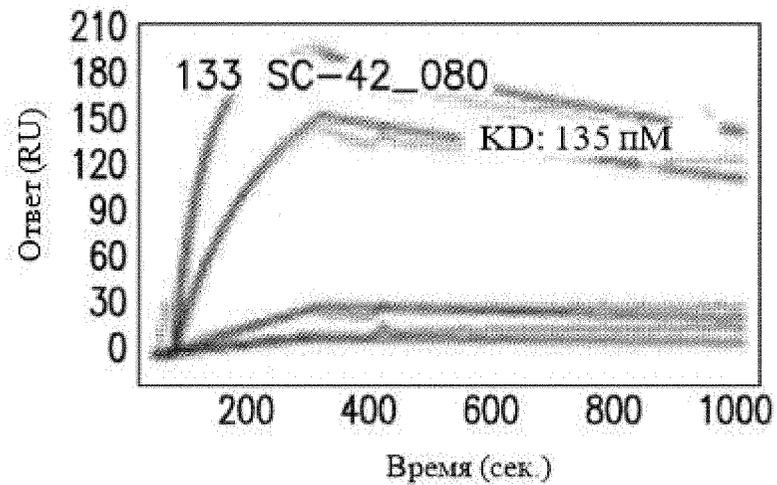
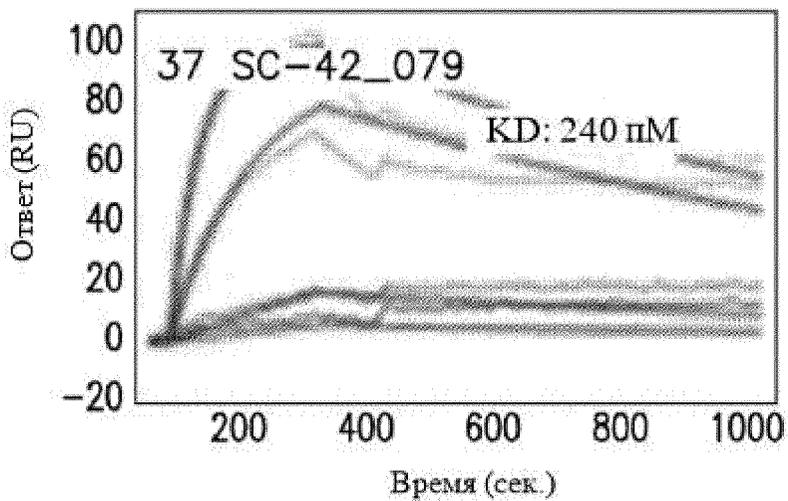
Фиг. 10 Продолжение



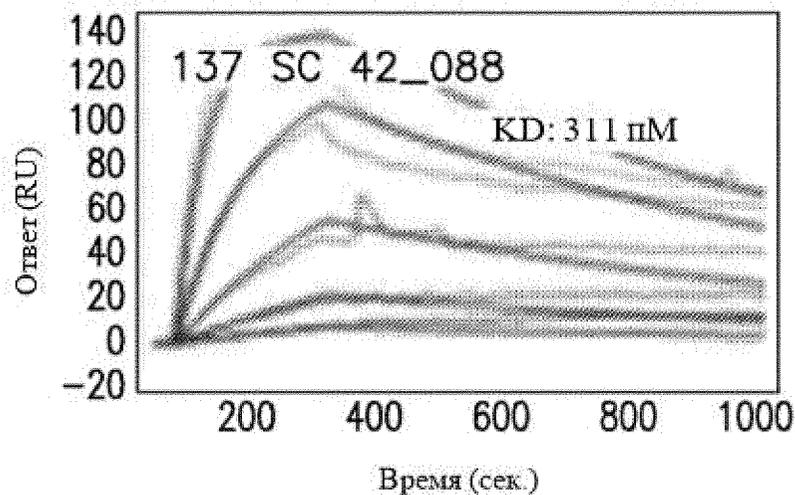
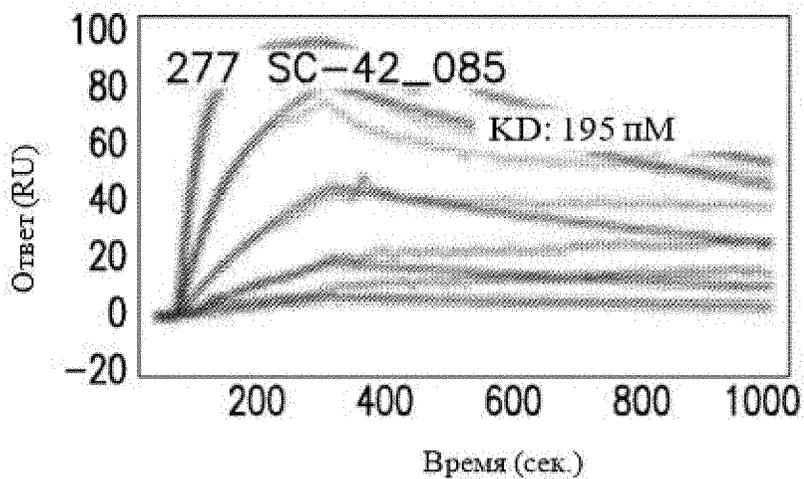
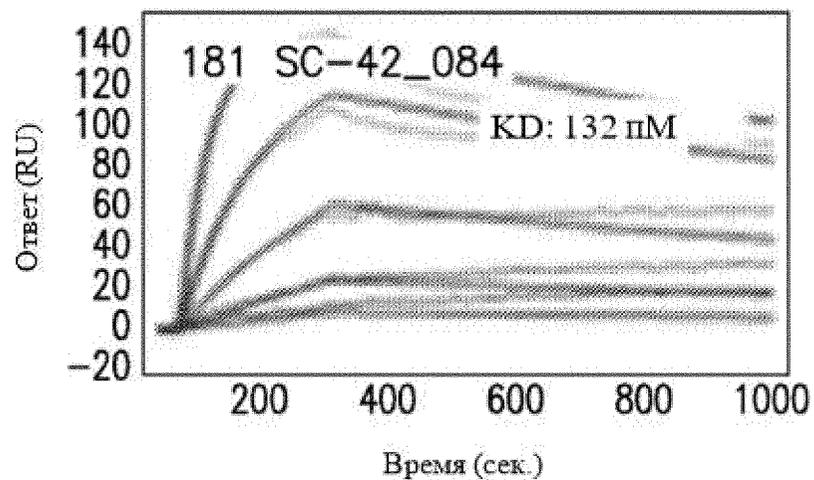
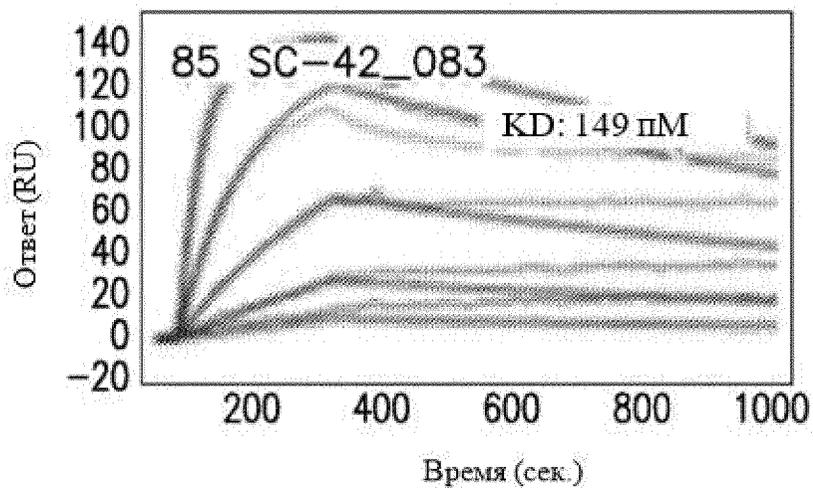
Фиг. 10 Продолжение



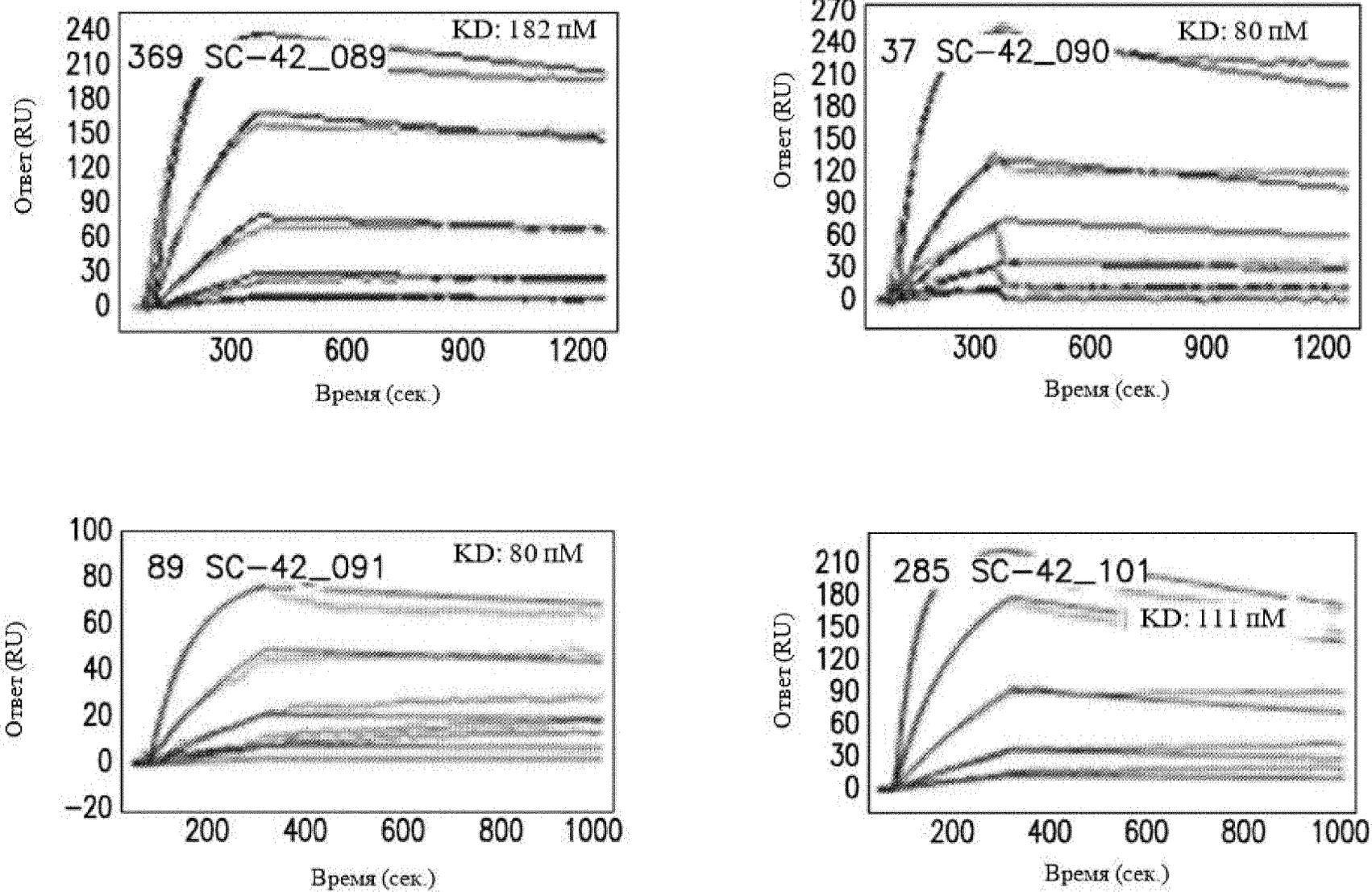
Фиг. 10 Продолжение



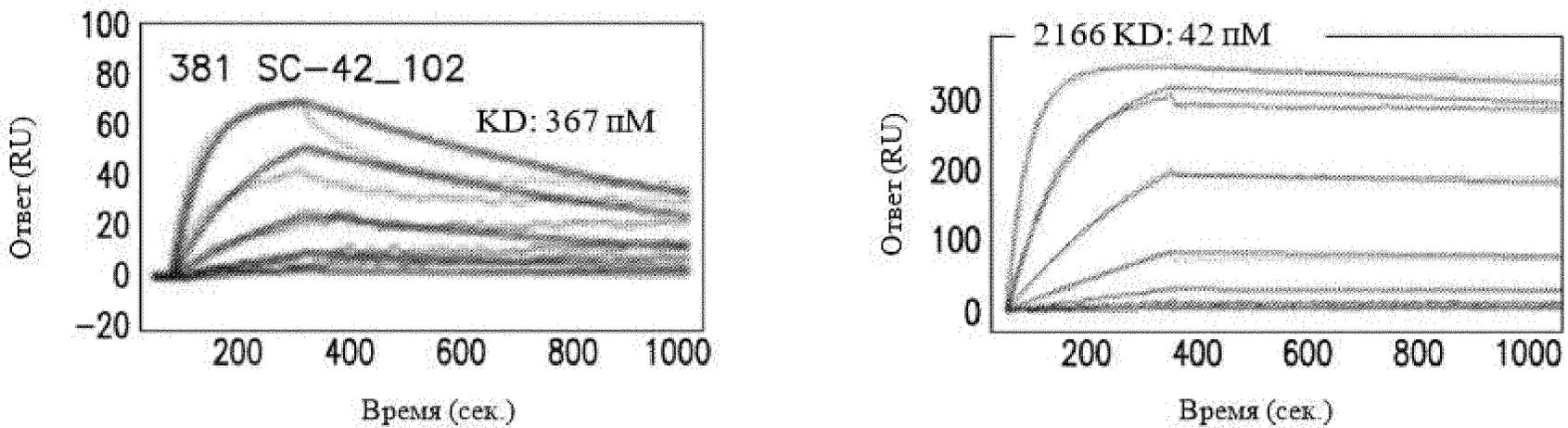
Фиг. 10 Продолжение



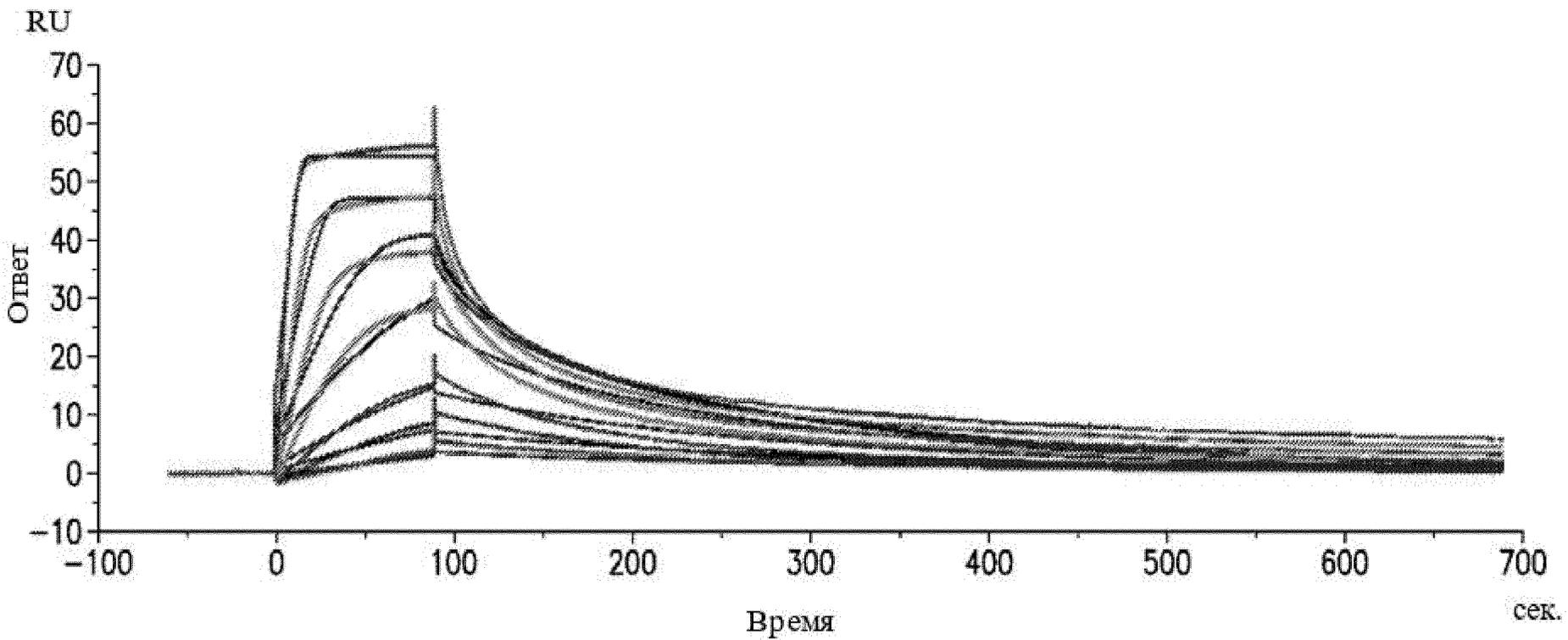
Фиг. 10 Продолжение



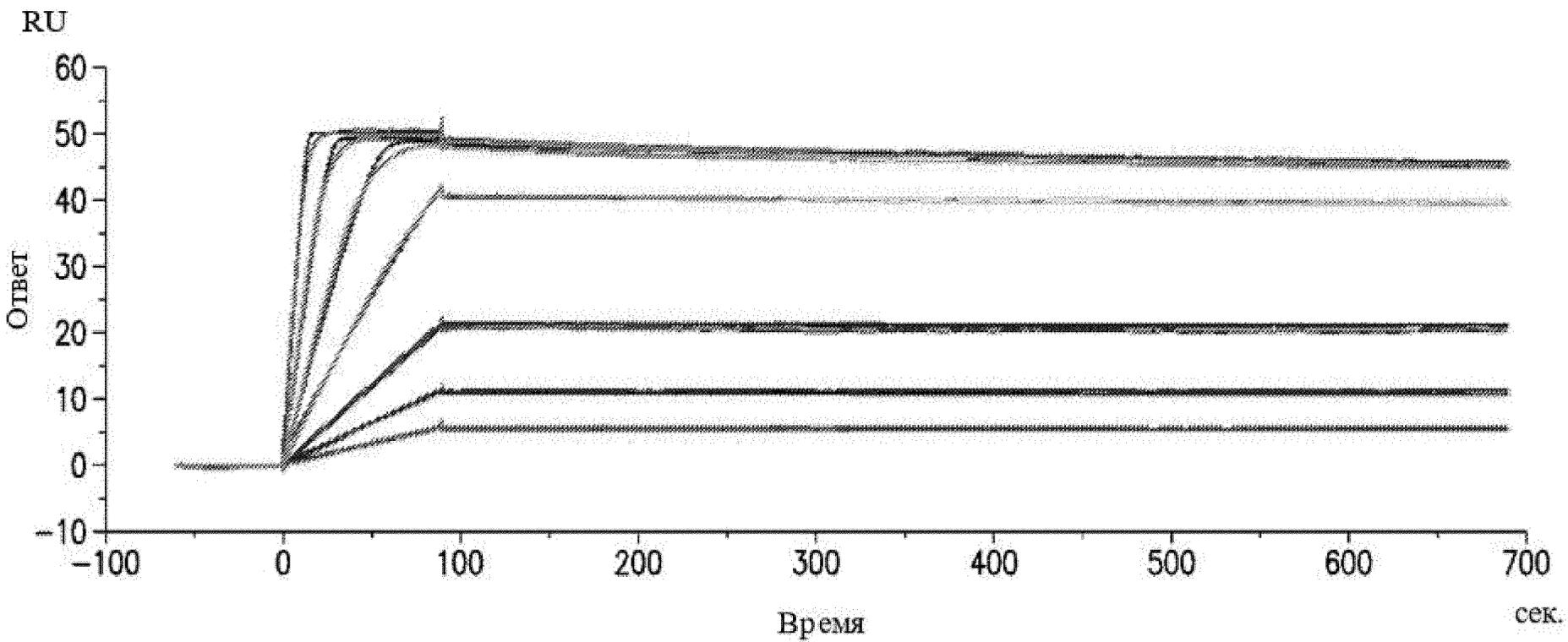
Фиг. 10 Продолжение



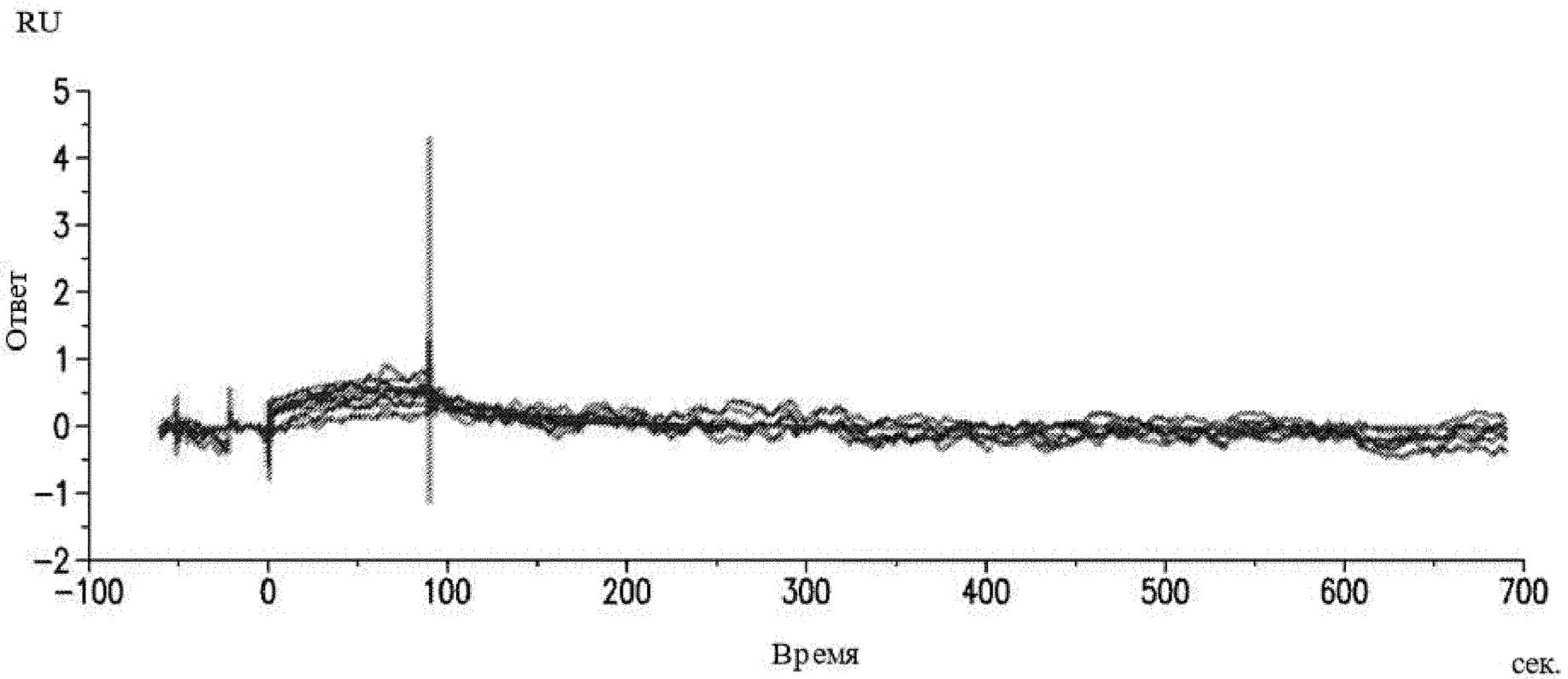
Фиг. 10 Продолжение



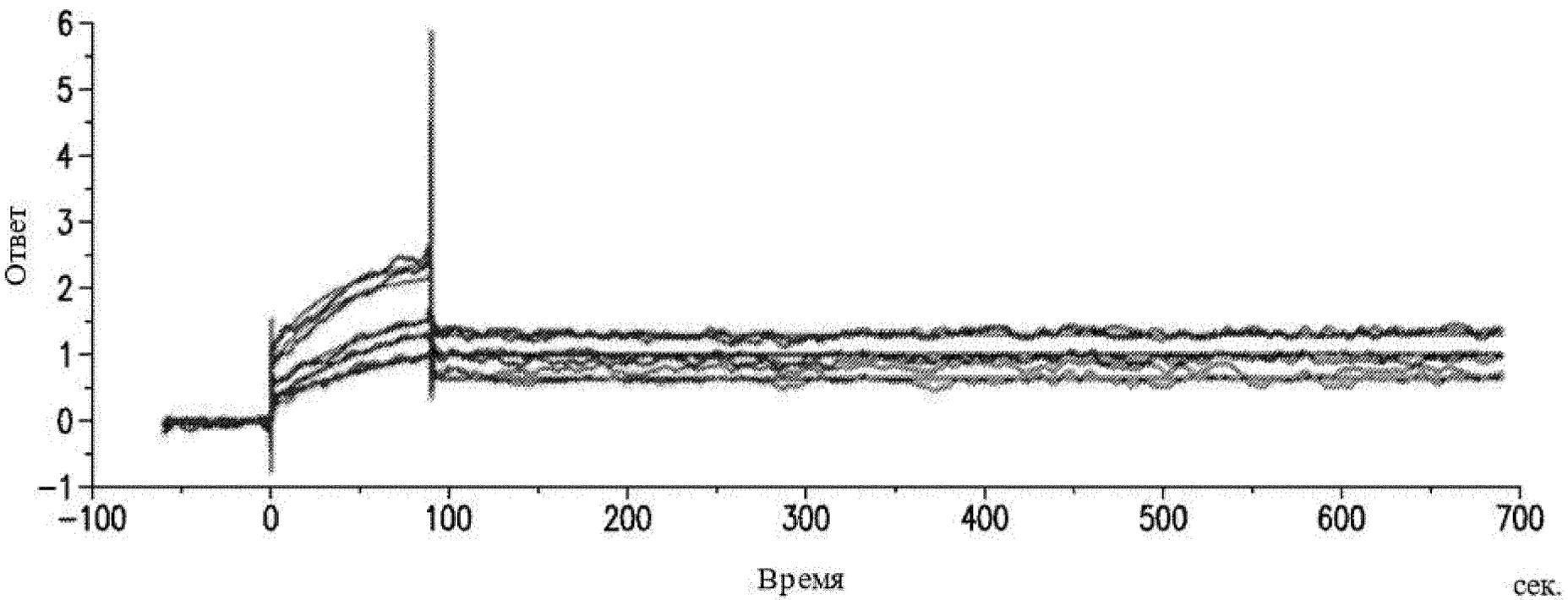
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

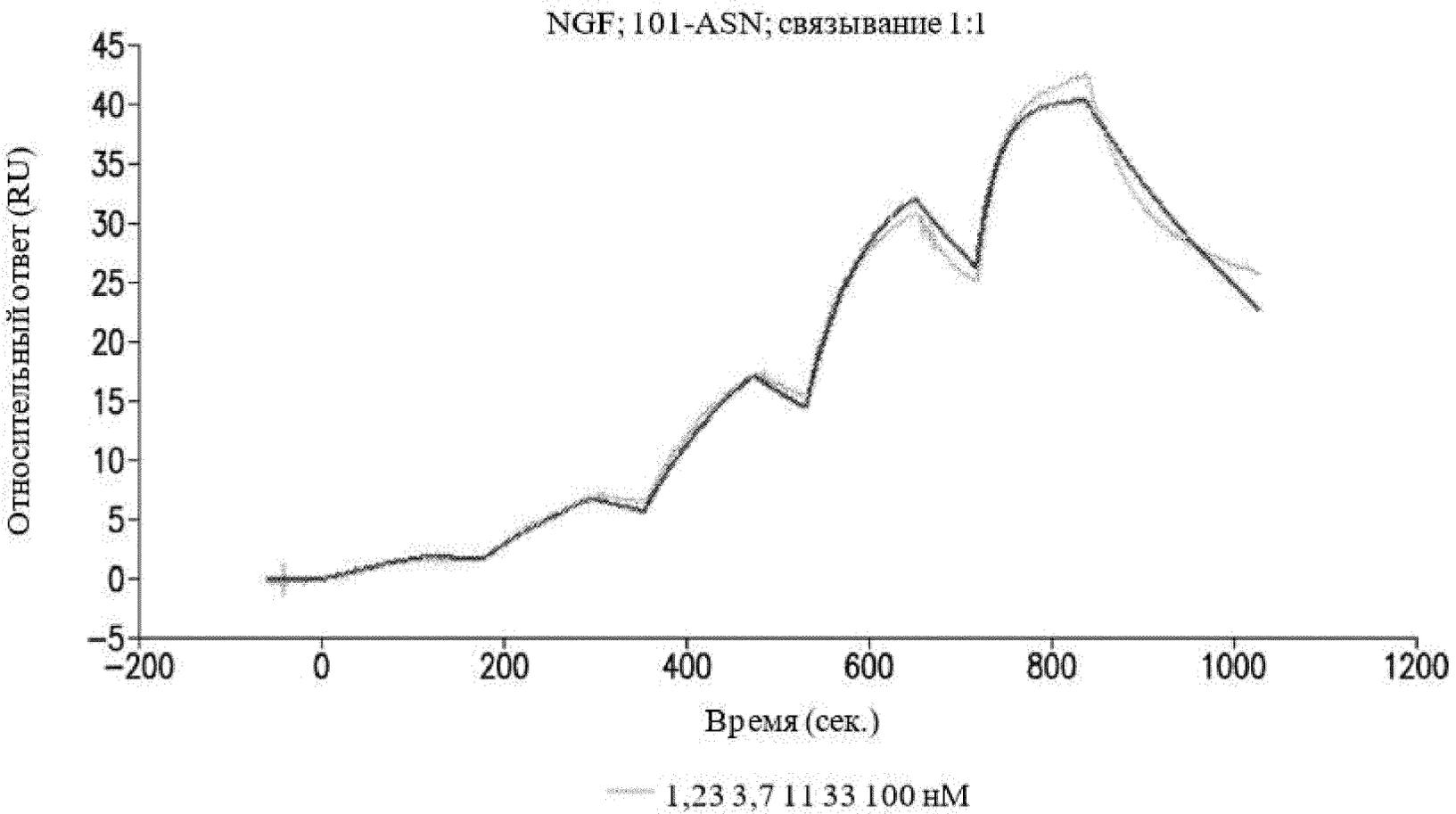
Вариабельный домен тяжелой цепи

DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVASGLSLTSSSMSWVRQAPGKGLQWVSTIYSNGGTYYTDSVKGRFTISKDN
AENTLYLQMNNLKTEDTATYYCASIYYDADYLHWYFD~~FWGQ~~GALVTVSS

Вариабельный домен легкой цепи

EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRASEGISNNLSWYQQTPGKAPKLLIYATSNLHSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQGYKWPLTFGGGTKLEIT

Фиг. 15



Фиг. 16

SEQ ID NO:	Название клона	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
141	101	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
184	AHF17591	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
185	AHF17593	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
186	AHF17594	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
187	AHF17601	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
188	AHF17602	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
189	AHF17603	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
190	AHF17605	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
198	SC-184_76	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSDS	MSWVRQAPGKGLQWVST	LWSNGGT
200	SC-184_102	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IWSNGGT
202	SC-184_110	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSAS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
204	SC-184_76-Arg	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSDS	MSWVRQAPGKGLQWVST	LWSNRGT
205	SC-184_102-Arg	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IWSNRGT
206	SC-184_110-Arg	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSAS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT

Фиг. 17A

SEQ ID NO:	Название клона	FR3H	CDR3H	FR4
141	101	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYDADYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
184	AHF17591	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYDADYLNHWYFDE	WGQGalVTVSS
185	AHF17593	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	AQIIYYDADYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
186	AHF17594	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYDADYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
187	AHF17601	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	AQIIYYDADYLNHWYFDE	WGQGalVTVSS
188	AHF17602	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYDADYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
189	AHF17603	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYDADYLNHWYFDE	WGQGalVTVSS
190	AHF17605	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	AQIIYYDADYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
198	SC-184_76	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYEADYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
200	SC-184_102	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYEAEYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
202	SC-184_110	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYEAEYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
204	SC-184_76-Arg	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYEADYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
205	SC-184_102-Arg	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYEAEYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS
206	SC-184_110-Arg	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIIYYEAEYLNHWYFDF	WGQGalVTVSS

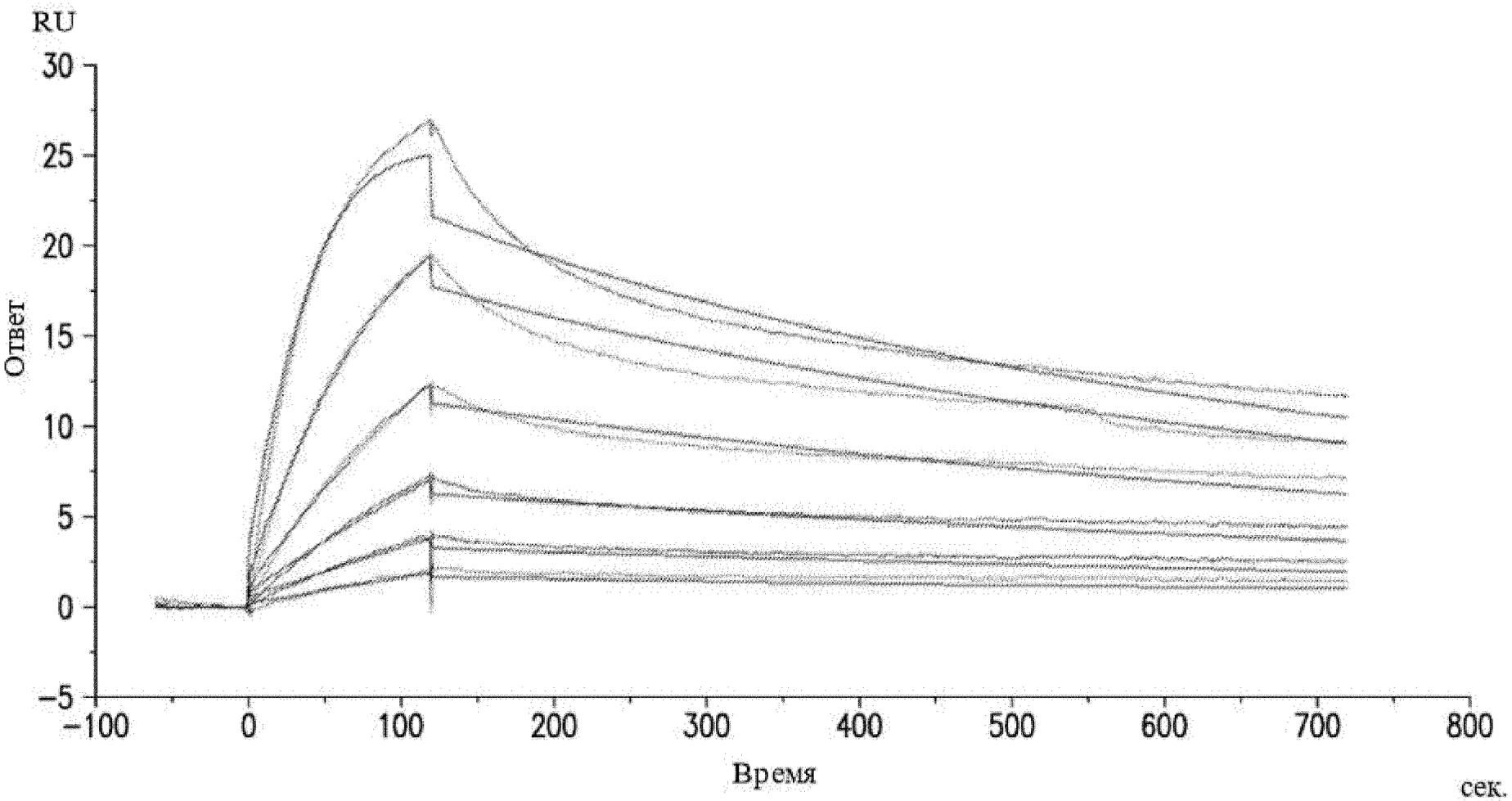
Фиг. 17А Продолжение

SEQ ID NO:	Название клона	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
142	101	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
191	AHF17591	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
192	AHF17592	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
193	AHF17593	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
194	AHF17595	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGIQNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
195	AHF17597	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGIQNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
196	AHF17602	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
197	AHF17607	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
199	SC-184_76	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
201	SC-184_102	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	KGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	AQS
203	SC-184_110	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGISKN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATD
199	SC-184_76-Arg	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
201	SC-184_102-Arg	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	KGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	AQS
203	SC-184_110-Arg	EIQMTQSPTSLASVGDRTITCRAS	EGISKN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATD

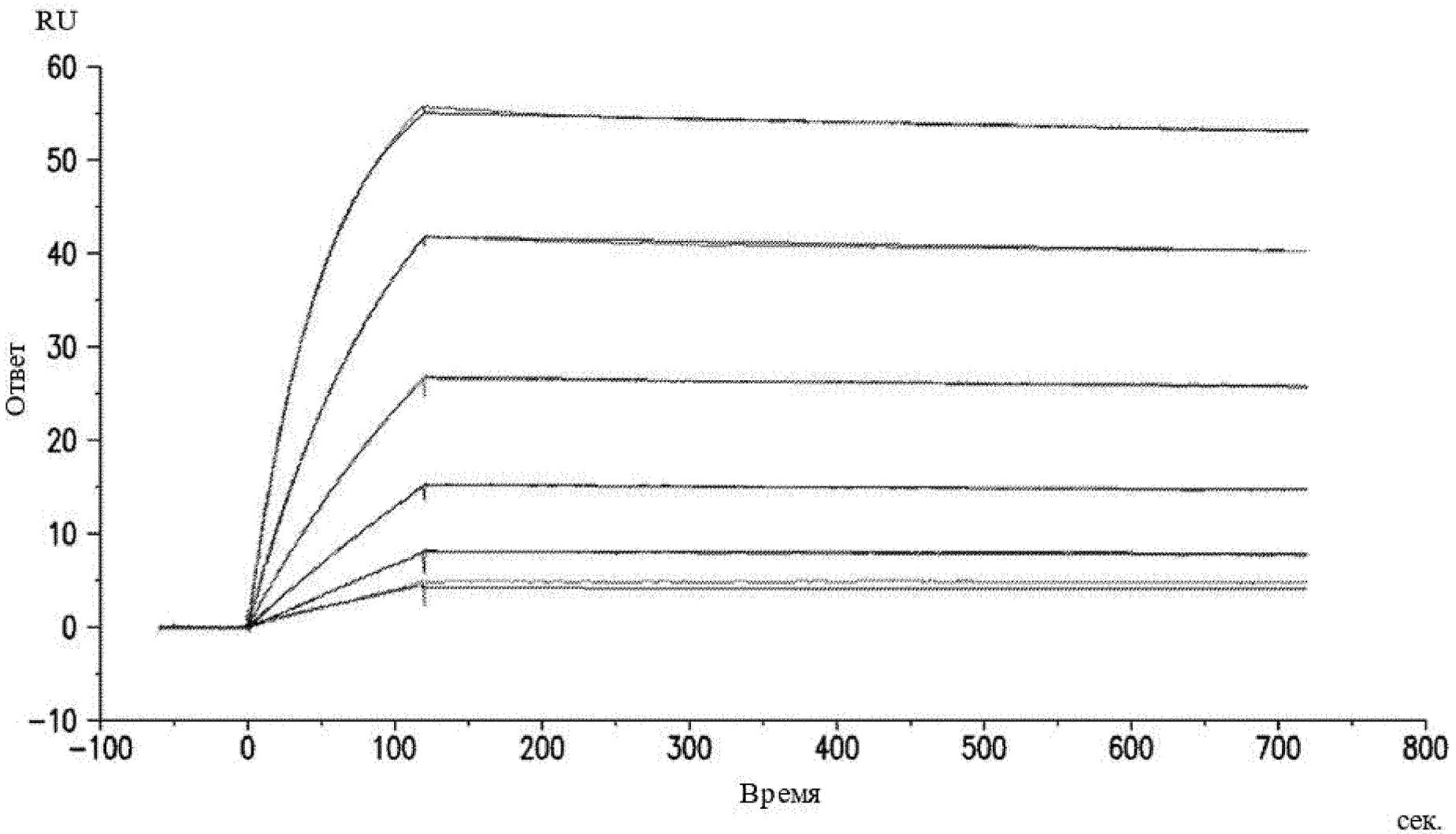
Фиг. 17B

SEQ ID NO:	Название клона	FR3L	CDR3L	FR4L
142	101	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
191	AHF17591	ILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
192	AHF17592	VLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
193	AHF17593	VLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
194	AHF17595	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
195	AHF17597	ILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
196	AHF17602	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
197	AHF17607	ILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
199	SC-184_76	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGFKWPLT	FGGGTKLEIT
201	SC-184_102	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
203	SC-184_110	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGKWPLT	FGGGTKLEIT
199	SC-184_76-Arg	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGFKWPLT	FGGGTKLEIT
201	SC-184_102-Arg	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
203	SC-184_110-Arg	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGKWPLT	FGGGTKLEIT

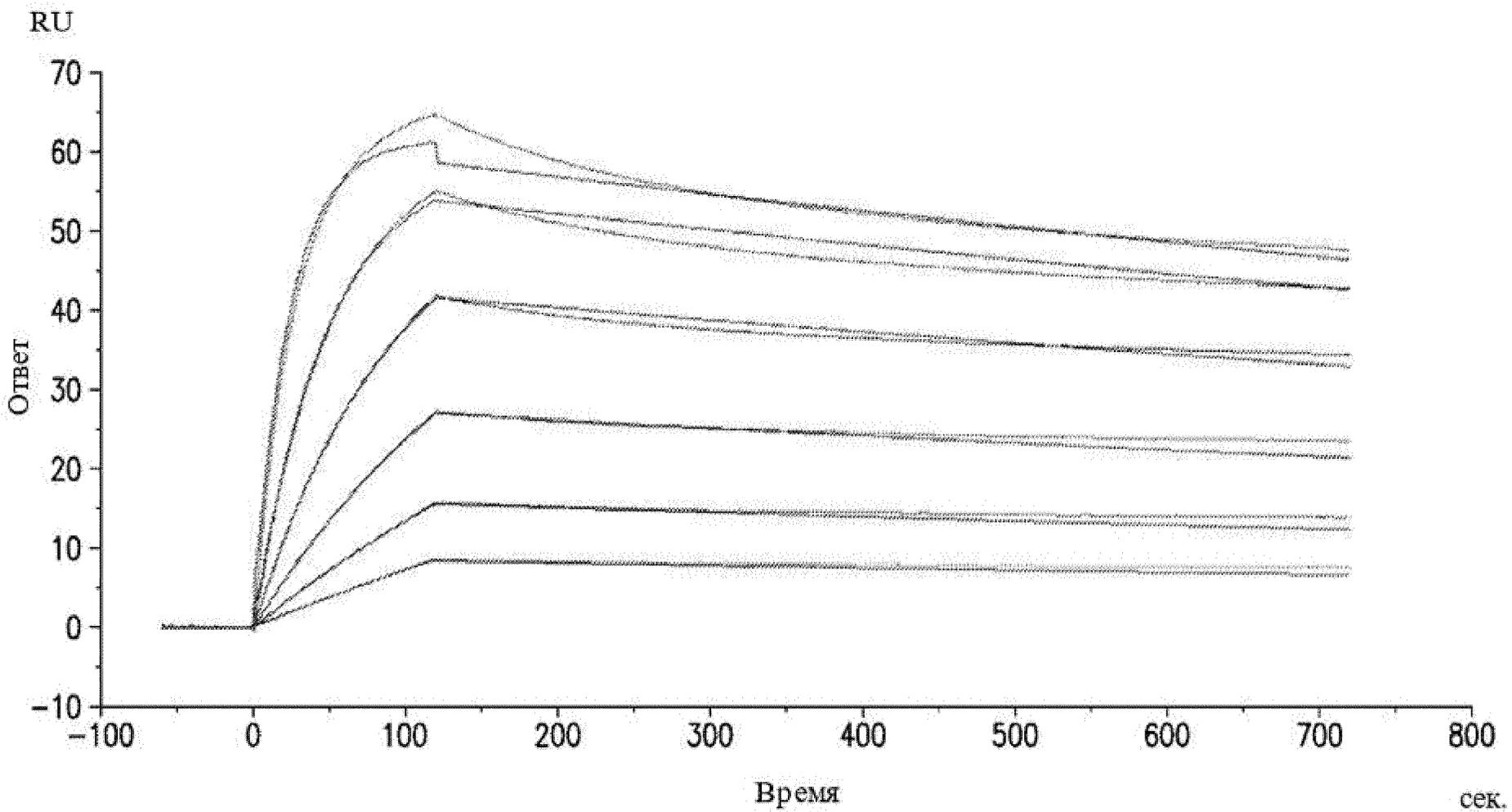
Фиг. 17В Продолжение



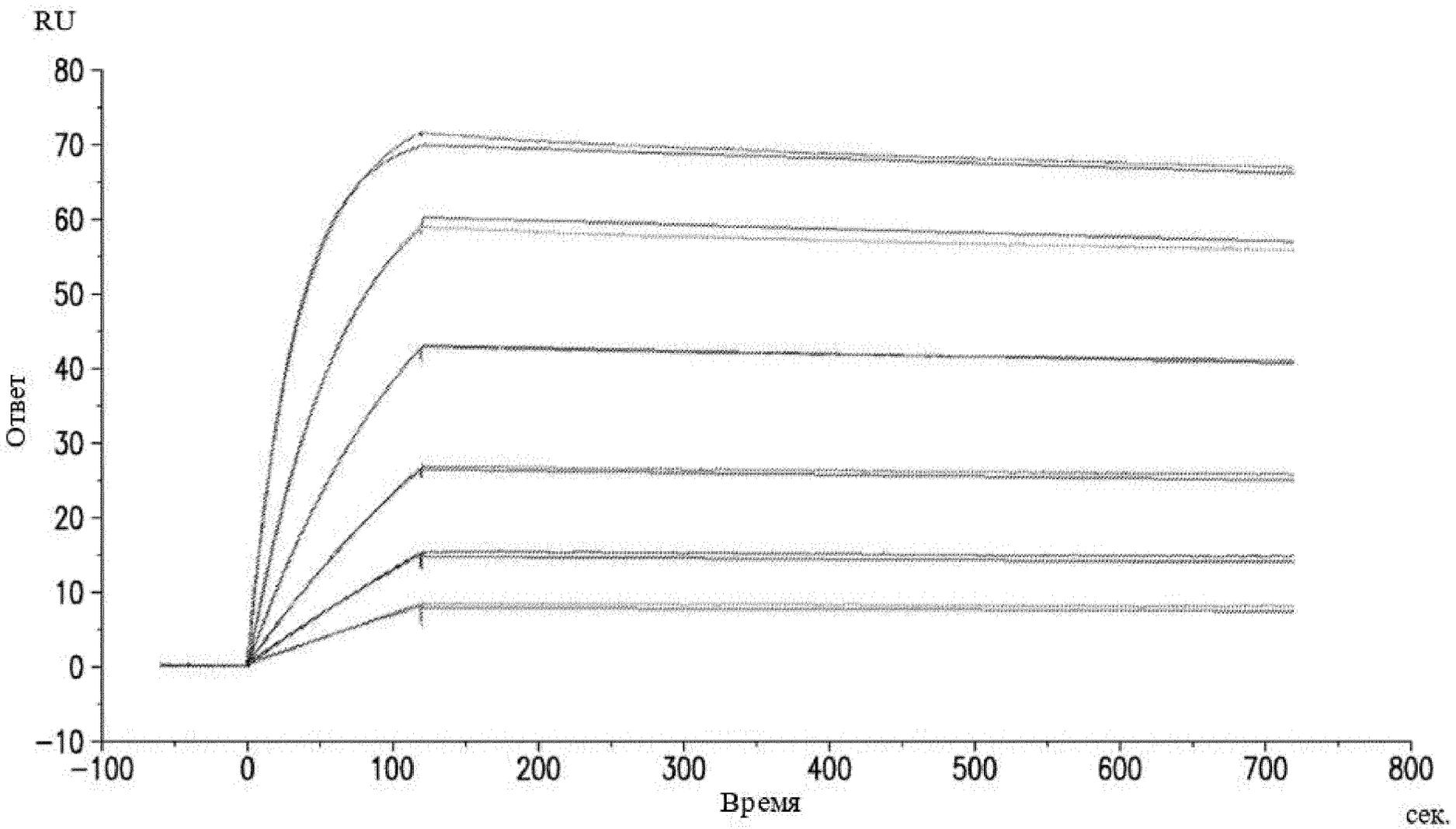
Фиг. 18А



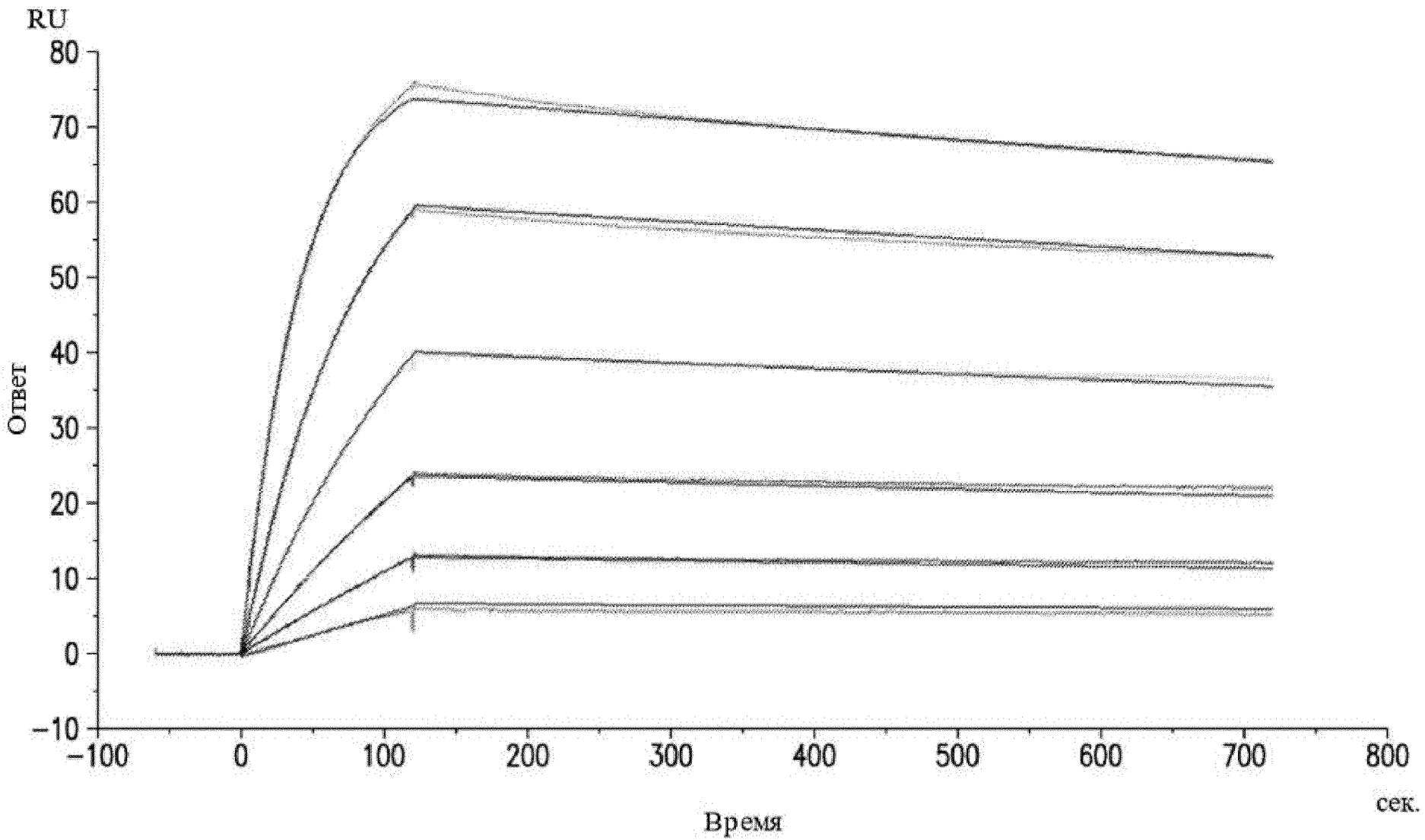
Фиг. 18В



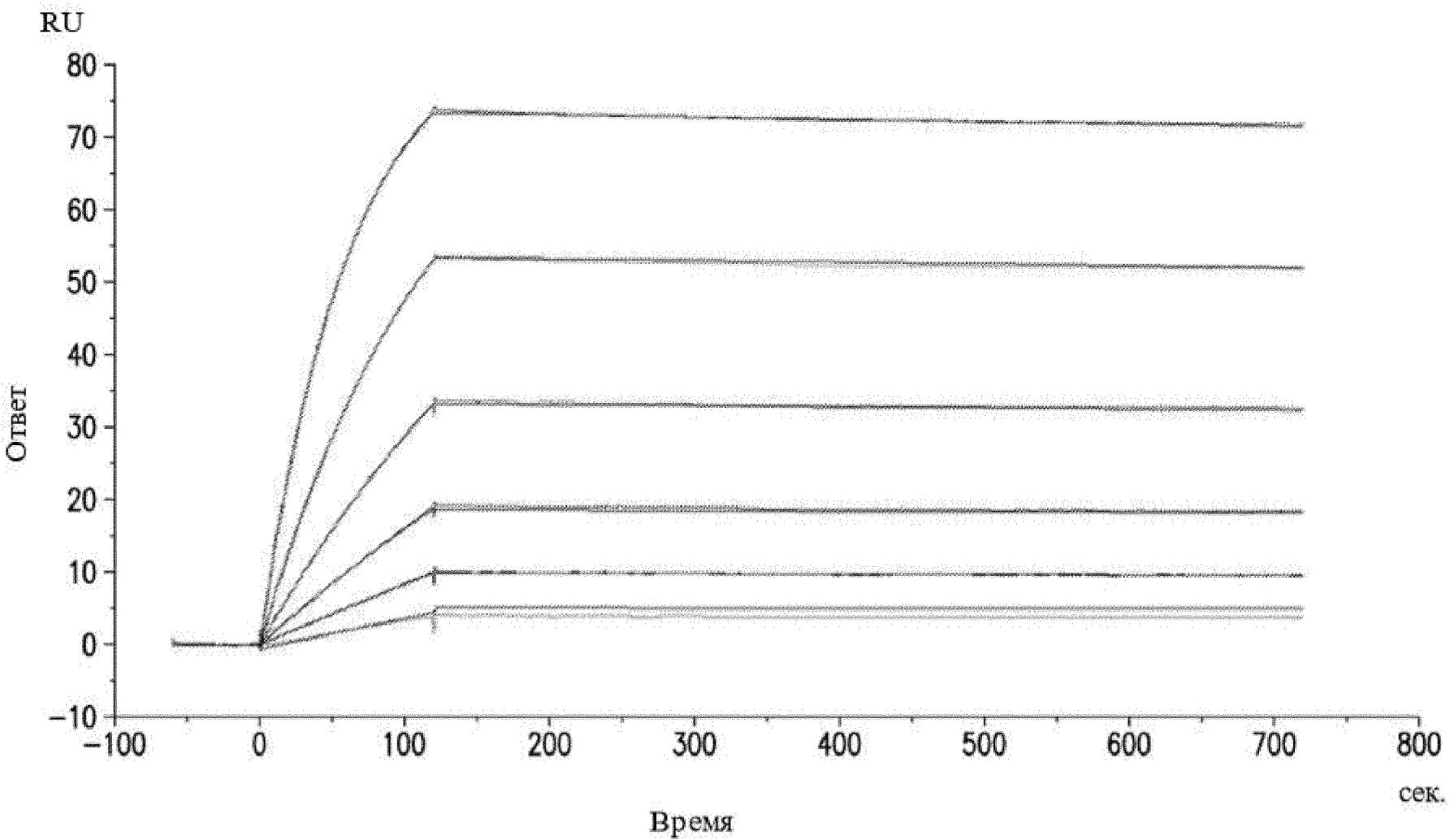
Фиг. 18С



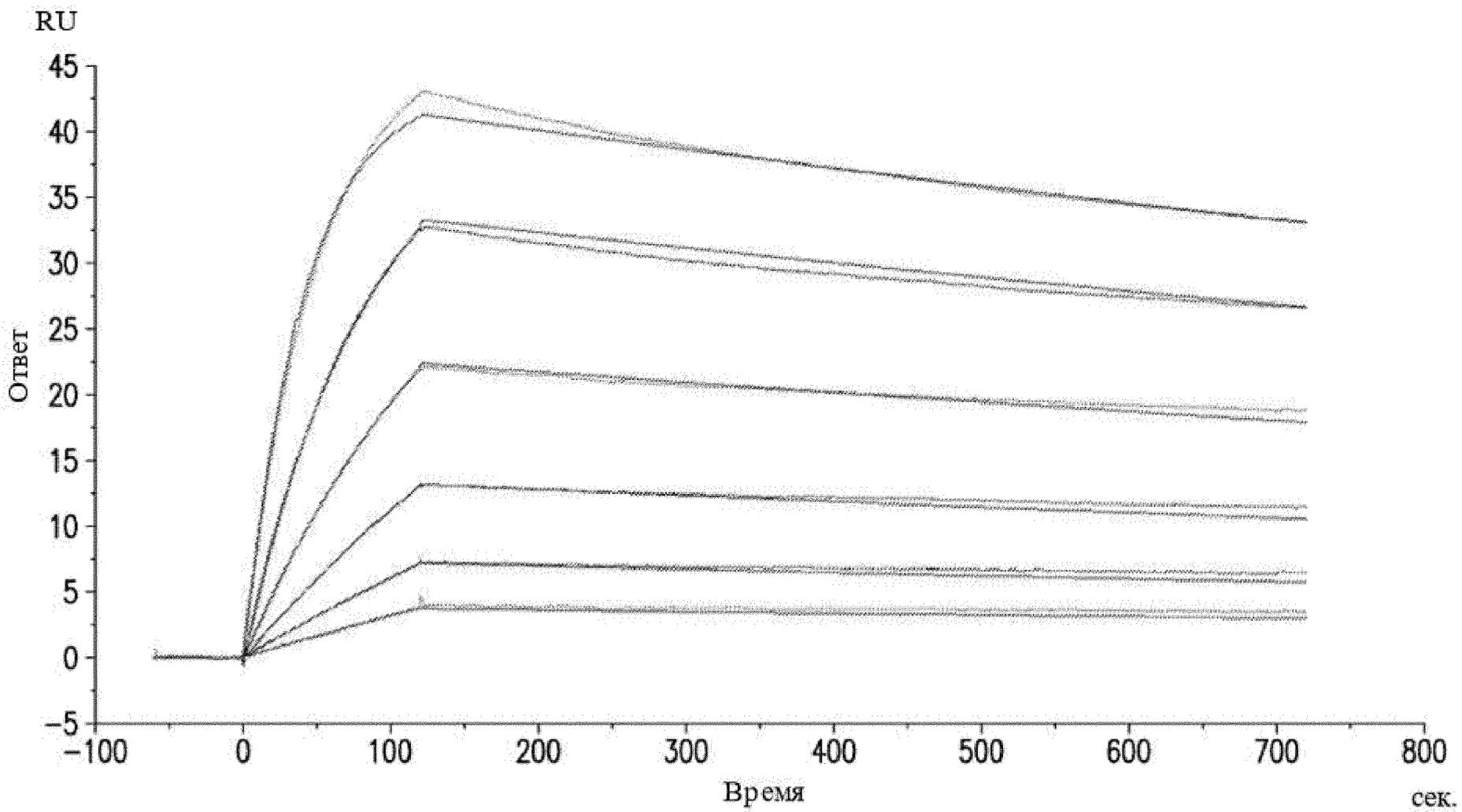
Фиг. 18D



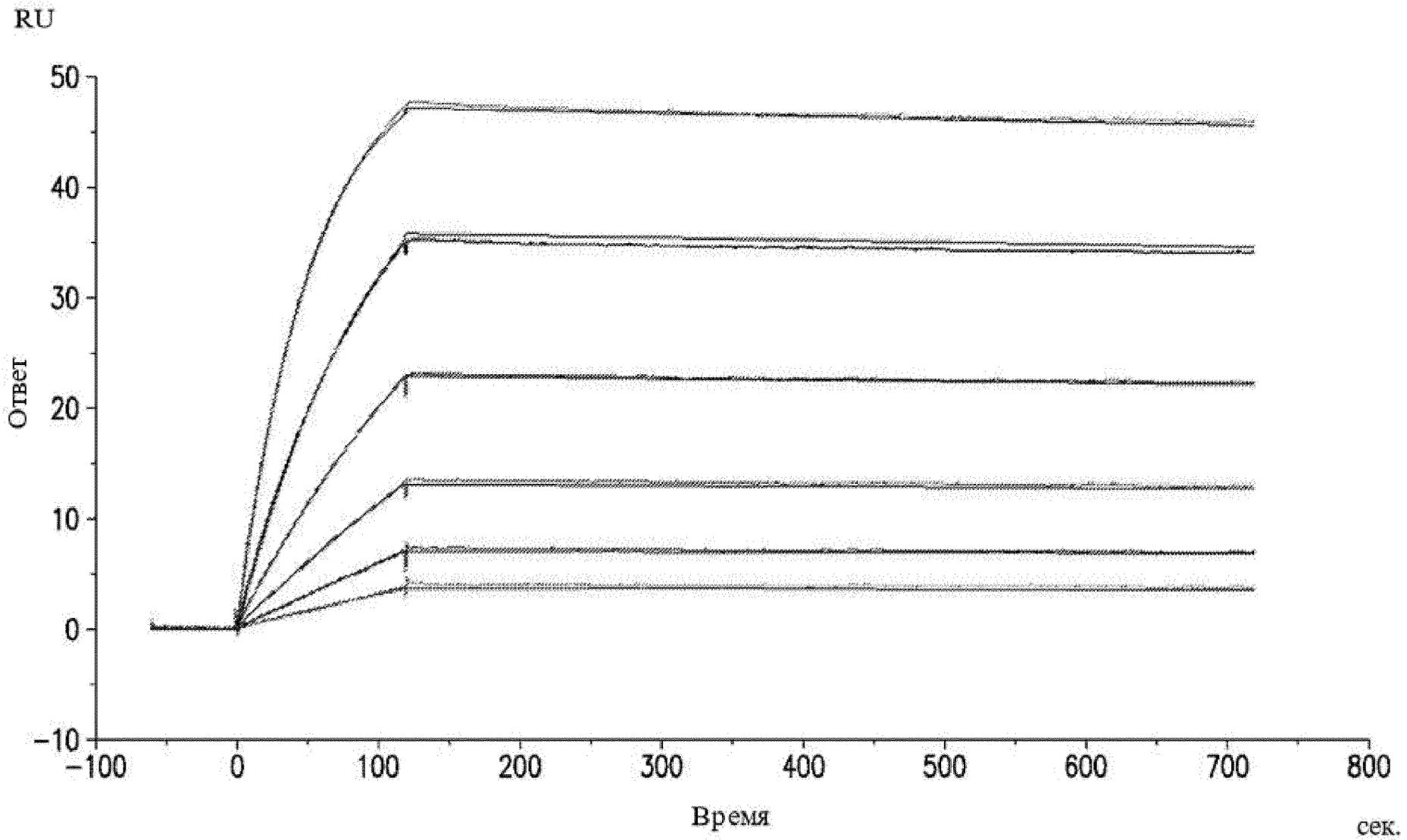
Фиг. 18Е



Фиг. 18F



Фиг. 18G



Фиг. 18Н