



(51) МПК  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 15/09* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C07K 16/28 (2020.08); C07K 16/2803 (2020.08); C12N 15/09 (2020.08); A61K 39/39533 (2020.08); A61P 9/10 (2020.08); A61K 2039/505 (2020.08); C07K 2317/24 (2020.08); C07K 2317/33 (2020.08); C07K 2317/76 (2020.08)*

(21)(22) Заявка: 2018107409, 05.08.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.08.2016

Дата регистрации:  
10.06.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
05.08.2015 EP 15179908.7

(43) Дата публикации заявки: 05.09.2019 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 10.06.2022 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 05.03.2018

(86) Заявка РСТ:  
EP 2016/068778 (05.08.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2017/021539 (09.02.2017)

Адрес для переписки:  
143430, Московская обл., Нахабино, ул.  
Советская, 28, кв. 59, Баландина Л.А.

(72) Автор(ы):

**БИЛЬАЛЬДЕ Филип (FR),  
ЖАНРО-ПЕРРУС Мартине (FR)**

(73) Патентообладатель(и):

**АКТИКОР БИОТЕК (FR),  
УНИВЕРСИТЕ ПАРИ СИТЕ (FR),  
УНИВЕРСИТЕ ПАРИ ХИИ (FR),  
ИНСТИТУТ НАСЬОНАЛ ДЕ ЛА  
САНТЕ РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ  
(ИНСЕРМ) (FR),  
УНИВЕРСИТЕ ПАРИ-САКЛЕ (FR)**

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: EP 2363416 A2, 07.09.2011. WO  
2011073954 A2, 23.06.2011. MANGIN P. H. et al.,  
A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse  
model to assess the antithrombotic efficacies of  
anti-GPVI agents, Journal of Pharmacology and  
Experimental Therapeutics, 2012, V. 341, N. 1,  
p.156-163. MUZARD J. et al., Design and  
humanization of a murine scFv that blocks human  
(см. прод.)

(54) Белок, связанный с гликопротеином человека, композиция, фармацевтическая композиция, вектор экспрессии

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к получению гуманизированного белка, специфически связывающего гликопротеин VI человека (hGPVI), и может быть использовано в медицине. Полученный белок, являющийся антиген-связывающим фрагментом антитела, где варибельная область тяжелой цепи содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 и варибельная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:9, может быть использован для лечения сердечно-сосудистого заболевания или события, связанного с тромбозом. 4 н. и 5 з.п. ф-лы, 14 ил., 1 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

platelet glycoprotein VI in vitro, *The FEBS journal*, 2009, V. 276, N. 15, p.4207-4222. ИВАНОВ А. С., Исследование межмолекулярных взаимодействий с помощью оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, *Современные технологии в медицине*, 2012, N. 4, с.142-153. HOLLIGER P. et al., Engineered antibody fragments and the rise of single domains, *Nature biotechnology*, 2005, V. 23, N. 9, p.1126-1136. КУЗНЕЦОВ С. А., Большой толковый словарь русского языка, Норинт, 2000, с.1433. KONTERMANN R. et al., *Antibody engineering: Volume 2*, Springer, 2010, с.45. SAFDARI Y. et al., Antibody humanization methods - a review and update, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2013, V. 29, N. 2, p.175-186. KLEIN F. et al., Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization, *Cell*, 2013, V. 153, N. 1, p.126-138. TEPLYAKOV A. et al., Antibody modeling assessment II. Structures and models, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2014, V. 82, N. 8, p.1563-1582. CHEN X. et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality, *Advanced drug delivery reviews*, 2013, V. 65, N. 10, p.1357-1369. MAEDA Y. et al., Engineering of functional chimeric protein G-VargulaLuciferase, *Analytical biochemistry*, 1997, V. 249, N. 2, p.147-152. TORRES M. et al., The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity, *Trends in immunology*, 2008, V. 29, N. 2, p.91-97. SUZUKI T. et al., Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR, *The journal of immunology*, 2010, V. 184, N. 4, p.1968-1976. BENJAMIN W. U. et al., Pharmacokinetics of peptide-Fc fusion proteins, *Journal of pharmaceutical sciences*, 2014, V. 103, N. 1, p.53-64.

R U 2 7 7 3 8 1 9 C 2 6 1 8 7 2 7 2

R U 2 7 7 3 8 1 9 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 15/09* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/28* (2020.08); *C07K 16/2803* (2020.08); *C12N 15/09* (2020.08); *A61K 39/39533* (2020.08); *A61P 9/10* (2020.08); *A61K 2039/505* (2020.08); *C07K 2317/24* (2020.08); *C07K 2317/33* (2020.08); *C07K 2317/76* (2020.08)

(21)(22) Application: **2018107409, 05.08.2016**(24) Effective date for property rights:  
**05.08.2016**Registration date:  
**10.06.2022**

Priority:

(30) Convention priority:  
**05.08.2015 EP 15179908.7**(43) Application published: **05.09.2019 Bull. № 25**(45) Date of publication: **10.06.2022 Bull. № 16**(85) Commencement of national phase: **05.03.2018**(86) PCT application:  
**EP 2016/068778 (05.08.2016)**(87) PCT publication:  
**WO 2017/021539 (09.02.2017)**Mail address:  
**143430, Moskovskaya obl., Nakhabino, ul.  
Sovetskaya, 28, kv. 59, Balandina L.A.**

(72) Inventor(s):

**BILALDE Filip (FR),  
ZHANRO-PERRUS Martine (FR)**

(73) Proprietor(s):

**AKTIKOR BIOTEK (FR),  
UNIVERSITE PARI SITE (FR),  
UNIVERSITE PARI KHIII (FR),  
INSTITYUT NASONAL DE LA SANTE  
RESHERSH MEDIKAL (INSERM) (FR),  
UNIVERSITE PARI-SAKLE (FR)**(54) **PROTEIN BOUND WITH HUMAN GLYCOPROTEIN, COMPOSITION, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, EXPRESSION VECTOR**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, namely to the production of a humanized protein specifically binding human glycoprotein VI (hGPVI); it can be used in medicine. The produced protein is an antigen-binding fragment of an antibody, where a variable region of a heavy chain contains an

amino acid sequence SEQ ID NO:7, and a variable region of a light chain contains a sequence SEQ ID NO:8 or SEQ ID NO:9.

EFFECT: produced protein can be used for the treatment of a cardiovascular disease or event associated with thrombosis.

9 cl, 14 dwg, 1 tbl, 5 ex

RU 2 773 819 C2

RU 2 773 819 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым антителам против гликопротеина VI человека и к их применению для лечения сердечнососудистых заболеваний.

Предпосылки создания изобретения

5 Острые нарушения коронарного и мозгового кровообращения в настоящее время являются основной причиной смерти в мире. Кроме того, общая частота рецидивов и смертельных случаев за 6-месячный период вслед за лечением после острого коронарного синдрома по-прежнему составляет 8-15%.

10 В случае острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST высокоэффективным является механическое лечение методом коронарной ангиопластики и введения стента с целью срочного восстановления кровотока в коронарной артерии, но это не предотвращает заболеваемость/смертность примерно у 15% пациентов в течение следующих 6 месяцев. Лечение тромболитиками, в основе которого лежит долгосрочная взаимосвязь фибринолитиков, антикоагулянтов и антиагрегантов, дает  
15 еще менее обнадеживающие результаты. Действительно, несмотря на улучшение лечения тромбоза, заболеваемость/смертность через 6 месяцев аналогична той, которая наблюдаются при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST.

20 Что касается ишемических нарушений мозгового кровообращения, их лечение по-прежнему очень ограничено из-за обычно запоздалого ухода за большинством пациентов и риска кровоизлияний, связанного с доступной в настоящее время антитромботической терапией.

25 Таким образом, по-прежнему существует клиническая потребность в улучшении лечения сердечнососудистых заболеваний и, в особенности, в новых молекулах с улучшенными свойствами по сравнению с доступными молекулами. Задачей, требующей решения, является получение молекул с высокой эффективностью в отношении патологического тромбоза, но без риска кровотечения.

30 Чтобы выполнить на это требование, мишень должна играть **большую** роль в тромбообразовании, происходящем в пораженном сосуде, чем при физиологическом гемостазе, необходимом для ограничения кровотечения в здоровом сосуде. Это относится к тромбоциту гликопротеин VI, который, как продемонстрировано на животных, играет определенную роль в экспериментальном тромбозе, включая инсульт, ремоделировании сосудов и крайне важен при тромбозе артерий, пораженных атеросклерозом.

35 В отличие от антагонистов интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , которые в настоящее время используются при лечении тромбоза и ингибируют фазу окончательной активации тромбоцитов, т.е. агрегацию тромбоцитов, и от антагонистов рекрутинга тромбоцитов (ингибиторов аденозиндифосфатного рецептора P2Y<sub>12</sub> и аспирина), GPVI вовлечен в несколько стадий формирования тромбоцитов: инициирование посредством взаимодействия с поврежденной стенкой сосуда, амплификацию посредством начальной  
40 активации тромбоцитов, приводящую к секреции вторичных агонистов, активацию интегринов и прокоагулянтную активность тромбоцитов, рост и стабилизацию посредством взаимодействия с фибрином (Mammadova и др., Blood 2015). Таким образом, антагонисты GPVI могут предотвращать не только агрегацию тромбоцитов, но и высвобождение вторичных агонистов, а также секрецию факторов роста и цитокинов,  
45 приводящую к развитию сосудистых поражений. Наконец, экспрессия GPVI ограничена тромбоцитами и мегакариоцитами и, следовательно, представляет собой в полной мере специфическую мишень для лечения тромбоза.

Соответственно, были разработаны антагонисты GPVI для лечения

сердечнососудистых заболеваний.

В заявках WO 2001/000810 и WO 2003/008454 описан растворимый рекомбинантный белок GPVI, который представляет собой гибридный белок внеклеточного домена GPVI и Fc-домена Ig человека. Этот растворимый рекомбинантный белок GPVI конкурирует с тромбоцитом GPVI за связывание коллагена. Обнадеживающие результаты применения этого растворимого белка GPVI были впервые получены на мышинной модели тромбоза, но эти результаты не были подтверждены. Кроме того, этот подход имеет структурные, функциональные и фармакологические недостатки. Во-первых, это соединение представляет собой высокомолекулярный химерный белок (с молекулярной массой ~160 кДа). Мишенью GPVI-Fc является коллаген, обнаруженный в месте повреждения сосудов, количество и доступность которого плохо предсказуемы, и, следовательно, количество вводимого продукта является потенциальным недостатком применения GPVI-Fc. Другим недостатком может являться риск иммунизации против неэпитопов, потенциально обнаруживаемых в гибридном белке.

Также описаны нейтрализующие моноклональные антитела, направленные против GPVI человека.

Например, в патентах EP 1224942 и EP 1228768 описано крысиное моноклональное антитело JAQ1 против GPVI, которое специфически связывает GPVI мыши, для лечения тромбоза. Антитело JAQ1 индуцирует необратимое поглощение рецептора GPVI тромбоцитами мыши.

В патенте EP 1538165 описано еще одно крысиное моноклональное антитело против GPVI (hGP 5C4), Fab-фрагмент которого, как обнаружено, оказывает выраженное ингибирующее действие на основные физиологические функции тромбоцитов, индуцированных стимуляцией коллагена: Fab hGP 5C4 полностью предотвращал стимуляцию маркеров опосредованной коллагеном физиологической активации PAC-1 и CD62P-селектина, а Fab hGP 5C4 эффективно ингибировал агрегацию тромбоцитов человека *ex vivo* без какой-либо собственной активности. Однако 5C4 является крысиным антителом и, следовательно, имеет весьма ограниченный терапевтический потенциал.

В заявке WO 2005/111083 описаны 4 мышинных моноклональных антитела OM1, OM2, OM3 и OM4 против GPVI, которые, как было обнаружено, ингибируют связывание GPVI коллагена, индуцированную коллагеном секрецию и образование *in vitro* тромбоксана A2 (TXA2), а также индуцированную коллагеном агрегацию *ex vivo* тромбоцитов после внутривенной инъекции яванским макакам. OM4 также, по-видимому, ингибирует тромбообразование на крысиной модели тромбоза.

В заявке WO 2001/000810 также описаны различные мышинные моноклональные антитела против GPVI, названные 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.3, 7H4.6, 9O12.2, 7H14.1 и 9E18.2, а также несколько scFv-фрагментов человеческих фаговых антител, названных A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 и D11. Было обнаружено, что некоторые из этих антител и scFv-фрагментов ингибируют связывание GPVI коллагена, включая антитела 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.3, 7H4.6 и 9O12.2, и scFv-фрагменты A10, A4, C10, B4, C3 и D11. Кроме того, было обнаружено, что Fab-фрагменты 9O12.2 полностью блокируют индуцированную коллагеном агрегацию и секрецию тромбоцитов, блокируют индуцированную фибрином агрегацию тромбоцитов, ингибируют прокоагулянтную активность стимулированных коллагеном или фибрином тромбоцитов и адгезию тромбоцитов с коллагеном или фибрином в статических условиях, ослабляют адгезию тромбоцитов и предотвращают тромбообразование в условиях артериального потока.

В заявке WO 2008/049928 описан полученный из 9O12.2 scFv-фрагмент, состоящий

из VH- и VL-доменов моноклонального антитела 9O12.2, связанного посредством пептида (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>.

Однако было показано, что ни одно из известных в настоящее время антител против GPVI не является эффективным *in vivo* для профилактики и/или лечения 5 сердечнососудистых заболеваний. В частности, большинство антител против GPVI, о которых сообщалось, не приспособлены для разработки антитромботического средства для медицинского применения человеком, в особенности, из-за их животного происхождения.

В частности, сообщалось, что некоторые человеческие фаговые антитела scFv против 10 GPVI человека, обладают ингибирующей активностью, но их аффинность, по-видимому, является низкой. Более того, сшивание GPVI на поверхности тромбоцитов двухвалентным или многовалентным лигандом, таким как цельный IgG 9O12.2, приводит к активации тромбоцитов посредством димеризации GPVI и сшивания GPVI с низкоаффинным Fc-рецептором (FcγRIIA). Напротив, одновалентные Fab- и scFv-фрагменты 9O12.2 обладают ингибирующей активностью. 15

Однако эти фрагменты не могут использоваться в терапевтических целях из-за их размера и животного происхождения, что делает их иммуногенными для пациентов-людей. Кроме того, scFv-фрагменты имеют короткий период полувыведения, что ограничивает их терапевтический потенциал.

20 Таким образом, по-прежнему существует потребность в нейтрализации антагонистов GPVI без иммуногенности для человека.

В заявке US 2006/0088531 описан человеческий scFv-фрагмент 10B12 с K<sub>D</sub> связывания GPVI человека около  $7.9 \times 10^{-7}$ . У М. Smethurst и др. 2004 также описан эпитоп, связанный 25 10B12 в Ig-подобном домене 1 (D1) типа C2 GPVI человека. Этот эпитоп содержит остатки R58, K61, R66, K79 и R80 GPVI человека (нумерация согласно инвентарному номеру Q9HCN6 в открытой базе данных последовательностей белков UniProtKB).

У O'Connor и др., 2006, также описан человеческий scFv-фрагмент 1C3 с низкой 30 аффинностью в отношении GPVI ( $5.4 \times 10^{-7}$  M), который не блокировал ни индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов, ни связывание GPVI коллагена, но усиливал ингибирующий эффект антитела 10B12. Эпитоп 1C3 в GPVI содержит аминокислоту P168, и также теоретически допускается, что этот эпитоп может охватывать область между остатками S164 и S182, которая является высококонсервативной при переносе человеку от мыши.

35 Таким образом, существует потребность в гуманизованном антителе (т.е. антителе без иммуногенности человеческая) с улучшенной аффинностью, эффективностью и периодом полувыведения по сравнению с известными антагонистами в качестве средства эффективного и достаточного предотвращения и/или лечения сердечнососудистых 40 болезней человека. Кроме того, эти антагонисты предпочтительно должны легко очищаться.

Описаны антитела против GPVI, индуцирующие истощенный фенотип GPVI (WO 2006/118350, WO 2011/073954, EP 2363416). В частности, в заявке WO 2006/118350 описано антитело против GPVI всех млекопитающих. Описан эпитоп GPVI, связываемый этим 45 антителом и соответствующий петлям 9 и 11 Ig-подобного домена 2 типа C2 IgGVI, которые соответствуют аминокислотным остаткам 136-142 и 158-162 соответственно.

Однако истощение GPVI нежелательно, так как оно не может контролироваться и является необратимым (т.е. оно длится в течение жизни тромбоцитов или даже дольше из-за истощения GPVI в мегакариоцитах).

В терапии требуется быстрый и безопасный антитромбоцитарный эффект. Поэтому следует разработать антитела, не индуцирующие истощенный фенотип GPVI и предпочтительно не индуцирующие снижение количества тромбоцитов *in vivo* (т.е. с обратимым эффектом).

5 Заявитель разработал антитело против GPVI, связывающее новый неописанный конформационный эпитоп. Это антитело против GPVI имеет высокую аффинность в отношении GPVI человека и блокирует взаимодействие GPVI с его лигандами (включая коллаген и фибрин), не уменьшая количество тромбоцитов и не истощая GPVI *in vivo*.  
10 Таким образом, настоящее изобретение относится к усовершенствованному гуманизированному нейтрализующему антителу, специфическому в отношении GPVI человека.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенному гуманизированному белку, связывающему гликопротеин VI человека (hGPVI), при этом белок связывает  
15 конформационный эпитоп, содержащий:

по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-142 hGPVI (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 114-142 hGPVI (SEQ ID NO: 13);  
и

20 по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 165-187 hGPVI (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 165-187 hGPVI (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления конформационный эпитоп, связанный выделенным гуманизированным белком согласно изобретению, содержит, по меньшей  
25 мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 121-135 hGPVI (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 121-135 hGPVI (SEQ ID NO: 13); и, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 169-183 hGPVI (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной на  
30 протяжении аминокислотных остатков 169-183 hGPVI (SEQ ID NO: 13).

Настоящее изобретение также относится к выделенному гуманизированному белку, связывающему гликопротеин VI человека (hGPVI), при этом белок имеет  $K_D$  связывания hGPVI менее 15 нМ, измеренную поверхностным плазменным резонансом с использованием 960-1071 RU растворимого GPVI человека и с использованием PBS с  
35 рН 7,4 в качестве подвижного буфера. В одном из вариантов осуществления выделенный гуманизированный белок согласно изобретению не индуцирует фенотип истощения GPVI *in vivo*.

В одном из вариантов осуществления белком согласно изобретению является молекула антитела, выбранного из группы, включающей цельное антитело,  
40 гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело, Fv, Fab; или фрагмент антитела, выбранный из группы, включающей унитело, доменное антитело и нанотело; или мономерное антитело-миметик, выбранное из группы, включающей аффитело, аффилин, аффитин, аднектин, атимер, эвазин, DARPin, антикалин, авимер, финомер и версатело.

В одном из вариантов осуществления антитело согласно изобретению является  
45 одновалентным.

В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит, по меньшей мере, один из следующих гипервариабельных участков (CDR):

VH-CDR1: GYTFTSYNMH (SEQ ID NO: 1);

VH-CDR2: GIYPGNGDTSYNQKFQG (SEQ ID NO: 2); и

VH-CDR3: GTVVGDWYFDV (SEQ ID NO: 3),

или любой CDR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60% идентичную SEQ ID NO: 1-3.

5 В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит, по меньшей мере, один из следующих CDR:

VL-CDR1: RSSQSLENSNGNTYLN (SEQ ID NO: 4);

VL-CDR2: RVSNRFS (SEQ ID NO: 5); и

VL-CDR3: LQLTHVPWT (SEQ ID NO: 6),

10 или любой CDR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60% идентичную SEQ ID NO: 4-6.

В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит, по меньшей мере, один из указанных выше CDR, а вариабельная область легкой цепи содержит, по меньшей мере, один из указанных выше CDR.

15 В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит следующие CDR: GYTFTSYNMH (SEQ ID NO: 1), GIYPGNGDTSYNQKFQG (SEQ ID NO: 2) и GTVVGDWYFDV (SEQ ID NO: 3), а вариабельная область легкой цепи содержит следующие CDR: RSSQSLENSNGNTYLN (SEQ ID NO: 4), RVSNRFS (SEQ ID NO: 5) и LQLTHVPWT (SEQ ID NO: 6) или любой CDR, имеющий аминокислотную  
20 последовательность, по меньшей мере, на 60% идентичную указанным SEQ ID NO: 1-6.

В одном из вариантов осуществления аминокислотной последовательностью, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи, является SEQ ID NO: 7, а аминокислотной последовательностью, кодирующей вариабельную область легкой  
25 цепи, является SEQ ID NO: 8 или любая аминокислотная последовательность, по меньшей мере, на 60% идентичная SEQ ID NO: 7 или 8.

В одном из вариантов осуществления аминокислотной последовательностью, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи, является SEQ ID NO: 7, а аминокислотной последовательностью, кодирующей вариабельную область легкой  
30 цепи, является SEQ ID NO: 9 или любая аминокислотная последовательность, по меньшей мере, на 60% идентичная SEQ ID NO: 7 или 9.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей белок, связывающий GPVI человека, как описано выше.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции,  
35 содержащей белок, связывающий GPVI человека, как описано выше, и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый эксципиент.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция согласно изобретению предназначена для лечения или для применения при лечении связанного с GPVI состояния.

40 В одном из вариантов осуществления указанным связанным с GPVI состоянием является сердечнососудистая болезнь, выбранная из артериального и венозного тромбоза, рестеноза, острого коронарного синдрома и ишемических нарушений мозгового кровообращения.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела против GPVI  
45 человека согласно изобретению для обнаружения GPVI в биологическом образце.

Другой задачей изобретения является создание вектора экспрессии, содержащего, по меньшей мере, одну из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 или любую последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере, на 60% идентичную

указанным SEQ ID NO: 10-12.

Подробное описание изобретения

Термин "гликопротеин VI (GPVI)" означает мембранный тромбоцитарный гликопротеин, который участвует во взаимодействиях тромбоцитов и коллагена. GPVI является трансмембранным коллагеновым рецептором, который экспрессирует на поверхности тромбоцитов. В одном из вариантов осуществления аминокислотной последовательностью GPVI человека является SEQ ID NO: 13 (инвентарный номер ВАА89353.1) или любая аминокислотная последовательность, по меньшей мере, на около 90% идентичная SEQ ID NO: 13, предпочтительно, по меньшей мере, на около 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичная SEQ ID NO: 13.

(SEQ ID NO: 13)

MSPSPTALFCLGLCLGRVPA (сигнальный пептид);

QSGPLPKPSLQALPSSLVPLEKPVTLRCQGGVVDLYRLEKLSSSRVYQDQ  
AVLFIPAMKRSLAGRYRCSYQNGSLWSLPSDQLELVATGVFAKPSLSAQPGP  
AVSSGGDVTLCQTRYGFDQFALYKEGDPAPYKNPERWYRASFPITVTAAN  
SGTYRCYSFSSRDPYLWSAPSDPLELVVTGTSVTPSRLPTEPPSSVAEFSEATA  
ELTVSFTNKVFTTETSRSITTSPKESDSPAGPARQYYTKGN (внеклеточный  
домен);

LVRICLGAVILILAGFLAEDWHSRRKRLRHRGRAVQRPLPPLPQTRK  
SHGGQDGGRQDVHSRGLCS (трансмембранный и цитоплазматический  
домены).

Внеклеточный домен GPVI состоит из двух Ig-подобных доменов C2-типа, а именно, D1 и D2, связанных шарнирной междоменной областью. В одном из вариантов осуществления D1 содержит аминокислотные остатки 21-109 SEQ ID NO: 13. В одном из вариантов осуществления шарнирная междоменная область между D1 и D2 содержит аминокислотные остатки 110-113 SEQ ID NO: 13. В одном из вариантов осуществления D2 содержит аминокислотные остатки 114-207 SEQ ID NO: 13.

Термин "около", предшествующий какой-либо численной величине, на 10% больше или меньше указанной величины.

Антитело или иммуноглобулин

Используемый термин "иммуноглобулин" означает белок, имеющий комбинацию из двух тяжелых и двух легких цепей независимо от того, обладает ли он какой-либо соответствующей специфической иммунореактивностью. Термин "антитела" означает узлы, которые обладают значительной известной специфической иммунореактивностью в отношении представляющего интерес антигена (например, GPVI человека). Термин "антитела против GPVI" означает антитела, которые демонстрируют иммуноспецифичность в отношении белка GPVI человека. Как пояснено далее, "специфичность" в отношении GPVI человека не исключает перекрестной реакции с видовыми гомологами GPVI. Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи с ковалентной связью между цепями или без нее. Основные структуры иммуноглобулина в системах позвоночных животных относительно хорошо изучены. Родовой термин "иммуноглобулин" охватывает антитела пяти различных классов, которые различимы биохимическими методами. Антитела всех пяти классов входят в объем настоящего изобретения; в следующем далее описании рассмотрен в основном

класс IgG молекул иммуноглобулина. Что касается IgG, иммуноглобулины содержат две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой около 23000 дальтон и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой около 53000-70000 дальтон. Все четыре цепи соединены дисульфидными связями с образованием Y-конфигурации, в которой легкие цепи разграничивают тяжелые цепи, начинающиеся в устье "Y" и продолжающиеся через переменную область. Легкие цепи антитела подразделяются на классы каппа и лямбда ( $[\kappa]$ ,  $[\lambda]$ ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана с легкой каппа-цепью или лямбда-цепью. Обычно легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" области обеих тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины образованы гибридами, В-клетками или генно-инженерными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах Y-конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи подразделяются на классы гамма, мю, альфа, дельта и эпсилон ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), которые имеют несколько подклассов (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA IgD или IgE, соответственно. Подклассы иммуноглобулина (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д. хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов являются легко распознаваемыми для специалиста в контексте настоящего описания и, соответственно, входят в объем настоящего изобретения. Как указано выше, переменная область антитела позволяет антителу избирательно распознавать и специфически связывать эпитопы в антигенах. Иными словами, переменный домен легкой цепи (VL-домен) и переменный домен тяжелой цепи (VH-домен) антитела объединяются с образованием переменной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт на конце каждого плеча "Y". Более точно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя гиперпеременными участками (CDR) в каждой из VH- и VL-цепей.

### 30 Выделенное антитело

Используемый термин "выделенное антитело" означает антитело, которое выделено и/или восстановлено из какого-либо компонента его природной среды. Загрязняющими компонентами его природной среды являются вещества, которые будут препятствовать диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые компоненты. В предпочтительных вариантах антитело очищают: (1) до достижения концентрации антитела более 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95% по весу или более, определенного методом Лоури, наиболее предпочтительно до достижения концентрации более 99% по весу; (2) до достижения степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до достижения однородности по данным SDS-PAGE в восстановительных или невосстановительных условиях и с использованием окрашивания голубым кумасси или предпочтительно серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках ввиду отсутствия, по меньшей мере, одного компонента природной среды антитела. Однако обычно выделенное антитело получают путем очистки, по меньшей мере, на одной стадии.

### Варианты аффинности

Используемый термин "вариант аффинности" означает вариантное антитело, которое

содержит одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным антителом против GPVI, при этом вариант аффинности имеет измененную аффинность в отношении белка GPVI человека по сравнению с эталонным антителом. Обычно варианты аффинности имеют улучшенную аффинность в отношении GPVI человека по сравнению с эталонным антителом против GPVI. Улучшением может 5 являться меньшая  $K_D$  GPVI человека, **бóльшая**  $K_A$  GPVI человека, **бóльшая** скорость ассоциации с GPVI человека или меньшая скорость диссоциации с GPVI человека или изменение схемы перекрестной реактивности с гомологами GPVI животных помимо человека. Варианты аффинности обычно имеют одно или несколько изменений CDR в 10 аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным антителом против GPVI. Такие замены могут приводить к замене исходной аминокислоты, присутствующей в заданном положении в CDR, отличающимся аминокислотным остатком, которым может являться встречающийся или не встречающийся в природе аминокислотный остаток. Замены аминокислот могут являться консервативными или неконсервативными.

#### 15 Сайт связывания

Используемый термин "сайт связывания" означает область белка, которая отвечает за избирательное связывание представляющего интерес целевого антигена (например, GPVI человека). Связывающие домены или области содержат, по меньшей мере, один сайт связывания. Примеры связывающих доменов включают переменный домен 20 антитела. Белок согласно изобретению может содержать один антигенсвязывающий сайт или множество (например, два, три или четыре) антигенсвязывающих сайтов. Однако предпочтительно, чтобы белок согласно изобретению содержал единственный антигенсвязывающий сайт.

#### 25 Консервативная замена аминокислоты

Используемый термин "консервативная замена аминокислоты" означает замену, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи известны из техники и включают основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновую кислоту, 30 глутаминовую кислоту), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). 35 Таким образом, несущественный аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина может быть заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления цепочка аминокислот может быть заменена структурно сходной цепочкой, которая отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей.

#### 40 Химерный белок

Используемый термин "химерный" белок означает белок, у которого первая аминокислотная последовательность связана со второй аминокислотной последовательностью, с которой она не связана в природе. Аминокислотные последовательности могут нормально существовать в отдельных белках, которые 45 объединены в гибридный белок, или могут нормально существовать в одном и том же белке, но иметь новое расположение в гибридном белке. Химерный белок может быть создан, например, путем химического синтеза или путем создания и преобразования полинуклеотида, в котором пептидные области закодированы в желаемой зависимости.

## Гипервариабельный участок

Используемый термин "гипервариабельный участок" или "CDR" означает несмежные антигенсвязывающие центры антител, находящиеся в вариабельной области полипептидов как с тяжелыми, так и легкими цепями. CDR были идентифицированы в соответствии со следующими правилами, установленными Kabat и др. (1991) и Chothia и Lesk (1987):

## CDR-L1:

Начало - приблизительно остаток 24

Предшествующим остатком всегда является Cys

Последующим остатком всегда является Trp. Обычно TRP-TYR-GLN, но также TRP-LEU-GLN, TRP-PHE-GLN, TRP-TYR-LEU

Длина от 10-17 остатков

## CDR-L2:

Начало - всегда через 16 остатков после окончания L1

Предшествующими остатками обычно являются ILE-TYR, но также, VAL-TYR, ILE-LYS, ILE-PHE Длина всегда 7 остатков.

## CDR-L3:

Начало - всегда через 33 остатка после окончания L2.

Предшествующим остатком всегда является Cys.

Последующими остатками всегда являются PHE-GL Y-XXX-GLY (SEQ ID NO: 21)

Длина от 7-11 остатков

## CDR-H1:

Начало - приблизительно остаток 26 (всегда через 4 остатка после CYS) [определение Chothia/AbM]; согласно определению Kabat начинается на 5 остатков позже

Предшествующими остатками всегда являются CYS-XXX-XXX-XXX (SEQ ID NO: 22)

Последующим остатком всегда является TRP. Обычно TRP-VAL, но также TRP-ILE, TRP-ALA

Длина 10-12 остатков (определение AbM); определение Chothia исключает последних 4 остатка

CDR-H2: начало - всегда через 15 остатков после окончания CDR-H1 согласно определению Kabat/AbM)

Предшествующими остатками обычно являются LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO: 23), но с рядом вариаций

Последующими остатками являются LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR ALA-THR/SEMLE/ALA

Длина 16-19 остатков согласно определению Kabat (согласно определению AbM заканчивается на 7 остатков раньше)

## CDR-H3:

Начало - всегда через 33 остатка после окончания CDR-H2 (всегда 2 остатка после CYS)

Предшествующими остатками всегда являются CYS-XXX-XXX (обычно CYS-ALA-ARG)

Последующими остатками всегда являются TRP-GLY-XXX-GLY (SEQ ID NO: 24)

Длина 3-25 остатков

## CH2-домен

Используемый термин "CH2-домен" означает область молекулы с тяжелой цепью, которая обычно проходит от около аминокислоты 231 примерно до аминокислоты

340. CH2-домен уникален тем, что он не образует тесную парную связь с другим доменом. Напротив, между двумя CH2-доменами интактной нативной молекулы IgG находятся две N-связанные разветвленные углеводные цепи. Предполагалось, что углевод может обеспечивать замену попарному связыванию доменов и помогать стабилизировать CH2-домен (Burton, Molec. Immunol. 22 (1985) 161-206).

#### Производное

Используемый термин "производное" указанного белка (например, антитела против GPVI или его антигенсвязывающего фрагмента) означает происхождение белка. В одном из вариантов осуществления белковой или аминокислотной последовательностью, производной конкретного исходного белка, является последовательность CDR или связанная с ней последовательность. В одном из вариантов осуществления аминокислотная последовательность, производная конкретного исходного белка, не является смежной. Например, в одном из вариантов осуществления производным исходного антитела является один, два, три, четыре, пять или шесть CDR. В одном из вариантов осуществления белковой или аминокислотной последовательностью, производной конкретного исходного белка или аминокислотной последовательности, является аминокислотная последовательность, которая преимущественно идентична исходной аминокислотной последовательности или ее области, состоящей, по меньшей мере, из 3-5 аминокислот, по меньшей мере, 5-10 аминокислот, по меньшей мере, 10-20 аминокислот, по меньшей мере, 20-30 аминокислот или, по меньшей мере, 30-50 аминокислот, или происхождение которой от исходной последовательности может быть иначе распознано специалистом в данной области техники. В одном из вариантов осуществления одна или несколько последовательностей CDR, производных исходного антитела, изменены с целью получения вариантных последовательностей CDR, вариантов аффинности, при этом вариантные последовательности CDR сохраняют связывающую активность в отношении GPVI.

#### Диатела

Используемый термин "диатела" означает небольшие фрагменты антител, полученные путем конструирования фрагментов sFv (см. раздел sFv) с помощью коротких линкеров (около 5-10 остатков) между VH- и VL-доменами, в результате чего достигается межцепочечное, а не внутрицепочечное попарное связывание V-доменов, что приводит к получению двухвалентного фрагмента, то есть фрагмента, имеющего два антигенсвязывающих сайта. Биспецифические диатела являются гетеродимерами двух "кроссоверных" sFv-фрагментов, у которых в различающихся полипептидных цепях присутствуют VH и VL-домены обоих антител. Диатела более подробно описаны, например, в патенте EP 0404097; заявке WO 1993/011161; и у Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 6444-6448 (1993).

#### Биоинженерия

Используемый термин "биоинженерный" означает манипулирование молекулами нуклеиновых кислот или полипептидов методами синтеза (например, с рекомбинантными методами, методами пептидного синтеза *in vitro*, путем ферментативного или химического сопряжения пептидов или применения какого-либо сочетания этих методов). Антителами согласно изобретению предпочтительно являются биоинженерные антитела, включая, например, гуманизированные и/или химерные антитела, и антитела, сконструированные с целью улучшения одного или нескольких свойств, таких как связывание антигена, стабильность/период полувыведения или эффекторная функция.

#### Эпитоп

Используемый термин "эпитоп" означает конкретное расположение аминокислот в

белке или белках, которые связывает антитело. Эпитопы часто состоят из химически активной поверхностной группировки молекул, таких как аминокислоты или боковые сахарные цепи, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Эпитопы могут являться линейными или конформационными, т.е. с участием двух или более последовательностей аминокислот в различных областях антигена, которые необязательно могут являться смежными.

#### Каркасная область

Используемый термин "каркасная область" или "FR-область" означает аминокислотные остатки, которые являются частью варибельной области, но не являются частью CDR (например, CDR согласно определению Kabat/Chothia). Следовательно, каркас варибельной области имеет длину около 100-120 аминокислот, но содержит только те аминокислоты, которые находятся за пределами CDR. В качестве конкретного примера варибельной области тяжелой цепи и CDR согласно определению Kabat/Chothia, каркасная область 1 может соответствовать домену варибельной области, охватывающему аминокислоты 1-25; каркасная область 2 может соответствовать домену варибельной области, охватывающему аминокислоты 36-49; каркасная область 3 может соответствовать домену варибельной области, охватывающему аминокислоты 67-98, а каркасная область 4 может соответствовать домену варибельной области, охватывающему аминокислоты от 110 до конца варибельной области. Каркасные области легкой цепи аналогичным образом разделены каждым из CDR варибельной области легкой цепи. У встречающихся в природе антител шесть CDR, присутствующих в каждом мономерном антителе, представляют собой короткие, несмежные последовательности аминокислот, которые имеют специфическое расположение с образованием антигенсвязывающего сайта, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остатки варибельных областей тяжелых и легких цепей демонстрируют меньшую межмолекулярную изменчивость в аминокислотной последовательности и называются каркасными областями. Каркасные области в значительной степени принимают бета-складчатую конформацию, при этом CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях составляют часть бета-складчатой структуры. Таким образом, эти каркасные области образуют клеточный каркас, который обеспечивает размещение шести CDR с правильной ориентацией путем межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий сайт, образованный позиционируемыми CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу иммунореактивного антигена. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с эпитопом иммунореактивного антигена. Положение CDR может легко распознаваться специалистом в данной области техники.

#### Фрагмент

Используемый термин "фрагмент" означает часть или область антитела или цепи антитела, содержащую меньшее число аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело или цепь антитела. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" означает белковый фрагмент иммуноглобулина или антитела, которое связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. интактным антителом, производным которого он является) за связывание антигена (т.е. специфическое связывание GPVI человека). Используемый термин "фрагмент" молекулы антитела означает антигенсвязывающие фрагменты антител, например варибельный домен легкой цепи (VL) антитела, варибельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, одноцепочечное антитело (scFv), F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, фрагмент однодоменного антитела (DAb), неполное (одновалентное) антитело, диатела или любую

антигенсвязывающую молекулу, образованную путем сочетания, сборки или конъюгации таких антигенсвязывающих фрагментов. Фрагменты могут быть получены, например, путем химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела или рекомбинантными методами.

5 Fv

Используемый термин "Fv" означает минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий сайт. Этот фрагмент состоит из димера одного домена варибельной области тяжелой цепи и одного домена варибельной области легкой цепи в тесной нековалентной связи. При складывании  
10 этих двух доменов образуются шесть гиперварибельных петель (по три петли из H- и L-цепей), которые вносят вклад в связывание антигена и придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один варибельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфических в отношении антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой  
15 афинностью, чем весь сайт связывания.

Область тяжелой цепи

Используемый термин "область тяжелой цепи" означает аминокислотные последовательности, являющиеся производными константных доменов тяжелой цепи иммуноглобулина. Белок, имеющий область тяжелой цепи, содержит, по меньшей мере,  
20 одно из следующего: CH1-домен, шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), CH2-домен, CH3-домен или их вариант или фрагмент. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула согласно изобретению может содержать Fc-область тяжелой цепи иммуноглобулина (например, шарнирный участок часть, CH2-домен и CH3-домен). В другом варианте осуществления  
25 связывающая молекула согласно изобретению не имеет, по меньшей мере, области константного домена (например, всего CH2-домена или его части). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один, предпочтительно все константные домены являются производными тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Например, в одном предпочтительном варианте осуществления область тяжелой цепи содержит  
30 целиком человеческий шарнирный домен. В других предпочтительных вариантах осуществления область тяжелой цепи содержит целиком человеческую Fc-область (например, шарнирные, CH2- и CH3-доменные последовательности человеческого иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления образующие область тяжелой цепи константные домены относятся к молекулам различных иммуноглобулинов.  
35 Например, область тяжелой цепи белка может содержать CH2-домен, являющийся производным молекулы IgG1, шарнирную область, являющуюся производной молекулы IgG3 или IgG4. В других вариантах осуществления константными доменами являются химерные домены, содержащие области молекул различных иммуноглобулинов. Например, шарнир может содержать первую область, являющуюся производной  
40 молекулы IgG1, и вторую область, являющуюся производной молекулы IgG3 или IgG4. Как указано выше, специалисту в данной области техники ясно, что константные домены области тяжелой цепи могут быть модифицированы таким образом, чтобы отличаться в аминокислотной последовательности от молекулы встречающегося в природе иммуноглобулина (дикого типа). Иными словами, описанные белки согласно изобретению могут содержать изменения или модификации в одном или нескольких константных доменах тяжелой цепи (CH1, шарнира, CH2 или CH3) и/или в константном домене легкой цепи (CL). Примеры модификаций включают добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких доменах.

### Шарнирная область

Используемый термин "шарнирная область" означает область молекулы тяжелой цепи, которая соединяет СН1-домен с СН2-доменом. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям перемещаться независимо друг от друга. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux и др., J. Immunol. 1998 161: 4083).

Термины "гипервариабельная петля" и "гипервариабельный участок" не являются строго синонимами, поскольку гипервариабельные петли (HV) характеризуются на основе структуры, а гипервариабельные участки (CDR) характеризуются на основе вариабельности последовательностей (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е издание Public Health Service, National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, США, 1983), при этом пределы HV и CDR могут различаться в некоторых VH- и VL-доменах. CDR VH-и VL-доменов обычно можно охарактеризовать согласно определению Kabat/Chothia (смотри выше). В одном из вариантов осуществления CDR VL- и VH-доменов могут содержать следующие аминокислоты: остатки 24-39 (CDRL1), 55-61 (CDRL2) и 94-102 (CDRL3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки 26-35 (CDRH1), 50-66 (CDRH2) и 99-109 (CDRH3) в вариабельном домене тяжелой цепи. Таким образом, HV могут входить в соответствующие CDR, при этом упоминание "гипервариабельных петель" VH- и VL-доменов следует считать также относящимся к соответствующим CDR и наоборот, если не указано иное. Более высококонсервативные области вариабельных доменов называются каркасной областью (FR), как описано далее. Вариабельные домены нативных тяжелых и легких цепей содержат по четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно), в основном, с бета-складчатой конфигурацией, соединенной тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга посредством FR и с гипервариабельными петлями из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта связывания, образуемого гипервариабельными участками (Chothia и др., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano и др., J. Mol. Biol, 215: 175-182 (1990)). Несмотря на высокую вариабельность их последовательностей, пять из шести петель имеют лишь небольшой набор конформаций главной цепи, называемых "каноническими структурами". Эти конформации в первую очередь определяются длиной петель, а во-вторых, присутствием в определенных положениях в петлях и в каркасных областях ключевых остатков, которые определяют конформацию посредством своей упаковки, водородных связей или способность принимать необычные конформаций основных цепей.

### Гуманизация

Используемый термин "гуманизированный" относится к химерным иммуноглобулинам, цепям иммуноглобулинов или их фрагментам (таким как Fv, Fab, Fab' или другим антигенсвязывающим подпоследовательностям антител), которые содержат минимальную последовательность, производную мышиного иммуноглобулина. Например, гуманизированными антителами являются человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельного участка (CDR) реципиента заменены остатками из CDR исходного антитела (донорного антитела) с сохранением желаемой специфичности, аффинности и связывающей способности исходного антитела.

### Гуманизирующие замены

Используемый термин "гуманизирующие замены" означает аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток, присутствующий в определенном положении в VH или VL-домене антитела животных помимо человека (например, мышинового антитела) против GPVI, заменен аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в эталонном человеческом VH или VL-домене. Эталонным человеческим VH- или VL-доменом может являться VH- или VL-домен, кодируемый зародышевой линией клеток человека, и в этом случае замещенные остатки могут именоваться "гуманизирующими заменами". Гуманизирующие замены могут делаться в упомянутых каркасных областях и/или CDR антитела против GPVI.

#### Высокая гомология белкам человека

Антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) считается имеющим высокую гомологию белкам человека, если аминокислотные последовательности вместе взятых VH- и VL-доменов, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более идентичны наиболее точно совпадающим последовательностям VH- и VL-доменов зародышевой линии клеток человека.

Антитела, имеющие высокую гомологию белкам человека, могут включать антитела, содержащие VH и VL-домены нативных антител животных помимо человека с достаточно высоким процентом идентичности последовательностям зародышевых линий клеток человека, а также биоинженерные, в особенности, гуманизированные варианты таких антител, а также "целиком человеческие" антитела. В одном из вариантов осуществления идентичность аминокислотных последовательностей или гомология последовательностей VH-домена антитела с высокой гомологией белку человека и одного или нескольких VH-доменов человека может составлять 75%, 80% или более на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах осуществления идентичность аминокислотных последовательностей или гомология последовательностей VH-домена белка согласно изобретению и наиболее точно совпадающей последовательности VH-домена зародышевых линий клеток человека может составлять 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более или до 99% или даже на 100%.

В одном из вариантов осуществления VH-домен антитела с высокой гомологией белку человека может содержать одно или несколько (например, от 1 до 20) несовпадений аминокислотных последовательностей, на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее точно совпадающей последовательностью VH-домена человека. В другом варианте осуществления идентичность или гомология последовательностей VL-домена антитела с высокой гомологией белку человека и одного или нескольких VL-доменов человека может составлять 80% или более на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах осуществления идентичность аминокислотных последовательностей или гомология последовательностей VL-домена белка согласно изобретению и наиболее точно совпадающей последовательности VL-домена зародышевых линий клеток человека может составлять 85% или более 90% или более, 95% или более, 97% или более или до 99% или даже на 100%.

В одном из вариантов осуществления VL-домен антитела с высокой гомологией белку человека может содержать одно или несколько (например, от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 5) несовпадений аминокислотных последовательностей на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее точно совпадающей последовательностью VL-домена человека. Перед анализом процентной идентичности последовательностей антитела с высокой гомологией белку человека и VH- и VL-доменов зародышевой

линии клеток человека могут быть определены канонические складки, которые позволяют идентифицировать семейство сегментов зародышевых линий клеток человека с одинаковой комбинацией канонических складок H1 и H2 или L1 и L2 (и L3).

Впоследствии выбирают член семейства зародышевых линий клеток человека, который  
5 имеет самую высокую степень гомологии последовательностей относительно  
вариабельной области представляющего интерес антитела, для оценки гомологии  
последовательностей. Определение канонических классов гипервариабельных петель  
L1, L2, L3, H1 и H2 согласно Chothia может осуществляться средствами биоинформатики,  
10 общедоступными на сайте [www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html](http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html). Результаты вычислений  
содержат требования к ключевым остаткам в файле данных. В этих файлах данных  
положения ключевых остатков показаны с разрешенными аминокислотами в каждом  
положении. Последовательность вариабельной области представляющего интерес  
антитела вводится в качестве входных данных и сначала совмещается с консенсусной  
15 последовательностью антитела с целью присвоения номера согласно схеме нумерации  
Kabat/Chothia. При анализе канонических складок используется набор шаблонов  
ключевых остатков, полученных автоматизированным методом, разработанным Martin  
и Thornton (Martin и др., J. Mol. Biol. 263: 800-815 (1996)). Если известен конкретный  
сегмент зародышевой линии V клеток человека, в котором используется одинаковая  
20 комбинация канонических складок для H1 и H2 или для L1 и L2 (и L3), можно определить  
наилучший совпадающий член семейства с точки зрения гомологии последовательностей.  
Средствами биоинформатики можно определить процент идентичности аминокислотных  
последовательностей VH и VL-доменов интересующего антитела и соответствующих  
последовательностей, кодируемых зародышевой линией клеток человека, но также  
25 может применяться выравнивание последовательностей вручную. Последовательности  
иммуноглобулина человека можно идентифицировать в нескольких базах данных  
белков, таких как база данных VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) или база данных  
Pluckthun/Honegger (<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines>). Для сравнения  
последовательностей человека с V-областями VH- или VL-доменов в интересующем  
30 антителе может использоваться алгоритм выравнивания последовательности, такой  
как алгоритм, доступный на сайтах, таких как [www.expasy.ch/tools/#align](http://www.expasy.ch/tools/#align), но также  
может осуществляться выравнивание вручную с ограниченным набором  
последовательностей. Выбирают последовательности легкой и тяжелой цепей семейств  
зародышевых линий клеток человека с одинаковыми комбинациями канонических  
35 складок и с наивысшей степенью гомологии каркасным областям 1, 2 и 3 каждой цепочки  
и сравнивают с представляющей интерес вариабельной областью; также проверяют  
FR4 на соответствие областям JH и JK или JL зародышевой линии клеток человека.  
Следует отметить, что при расчете общего процента гомологии последовательностей  
оценивают остатки FR1, FR2 и FR3 с использованием наиболее точно совпадающей  
40 последовательности из семейства зародышевых линий клеток человека с идентичной  
комбинацией канонических складок. Оценивают только остатки, отличающиеся от  
наиболее точного совпадения или других членов того же семейства с одинаковой  
комбинацией канонических складок (за исключением любых кодируемых праймером  
различий). Однако в целях гуманизации остатки в каркасных областях, идентичные  
45 членам других семейств зародышевых линий клеток человека, которые не имеют такой  
же комбинации канонических складок, могут считаться "человеческими", несмотря на  
то, что они оцениваются как "отрицательные" в соответствии с наиболее строгими  
условиями, описанными выше. В основе этого допущения лежит подход "смешивания  
и подгонки" к гуманизации, когда каждую из FR1, FR2, FR3 и FR4 по отдельности

сравнивают с наиболее точно совпадающей с ней последовательностью зародышевой линии клеток человека, в связи с чем гуманизованная молекула содержит комбинацию различных FR, как это было сделано Qu и коллегами (Qu и др., *Clin. Cancer Res.* 5: 3095-3100 (1999)) и Ono и коллегами (Ono и др., *Mol. Immunol.* 36: 387-395 (1999)). Границы отдельных каркасных областей могут устанавливаться с использованием схемы нумерации IMGT, которая является вариантом схемы нумерации Chothia (Lefranc и др., *Nucleic acid res* 27: 209-212 (1999); <http://im.gt.cines.fr>). Антитела с высокой гомологией белку человека могут содержать гипервариабельные петли или CDR, имеющие канонические складки человека или подобные складкам человека, как подробно описано далее. В одном из вариантов осуществления, по меньшей мере, одна гипервариабельная петля или CDR в VH-домене или VL-домене антитела с высокой гомологией белку человека может быть получена или выделена из VH-домена или VL-домена антитела животных помимо человека, но при этом имеют предсказанную или фактическую каноническую складчатую структуру, преимущественно идентичную канонической складчатой структуре, которая встречается в человеческих антителах. Из техники хорошо известно, что, хотя первичные аминокислотные последовательности гипервариабельных петель, присутствующие как в VH-доменах, так и в VL-доменах, кодируемых зародышевой линией клеток человека, по определению являются высоковариабельными, все гипервариабельные петли, за исключением CDR H3 VH-домена, имеют лишь несколько особых структурных конформаций, называемых каноническими складками (Chothia и др., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Tramontano и др., *Proteins* 6: 382-94 (1989)), которые зависят как от длины гипервариабельной петли, так и от присутствия так называемых канонических аминокислотных остатков (Chothia и др., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Фактические канонические структуры гипервариабельных петель в интактных VH- или VL-доменах могут определяться путем структурного анализа (например, рентгеновской кристаллографии), но каноническую структуру также можно предсказать на основе ключевых аминокислотных остатков, характерных для конкретной структуры (как подробнее описано далее). По сути, конкретная схема остатков, которая определяет каждую каноническую структуру, образует "подпись", позволяющую распознавать каноническую структуру в гипервариабельных петлях VH- или VL-домена неизвестной структуры; соответственно, канонические структуры можно предсказать на основе только первичной аминокислотной последовательности. Предсказанные канонические складчатые структуры гипервариабельных петель любой заданной последовательности VH- или VL-домена в антителе с высокой гомологией белку человека могут анализироваться с использованием алгоритмов, общедоступных на сайтах [www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html](http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html), [www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibodies.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibodies.html) и [www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase\\_hVh.html](http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hVh.html). Эти инструменты позволяют выравнивать искомые последовательности VH- или VL-доменов VH и последовательности VH- или VL-доменов человека с известной канонической структурой и предсказывать каноническую структуру гипервариабельных петель искомой последовательности. Что касается VH-домена, петли H1 и H2 могут оцениваться как имеющие каноническую складчатую структуру, "преимущественно идентичную" канонической структуре складки, которая, как известно, встречается в человеческих антителах, при выполнении, по меньшей мере, первого, предпочтительно обоих из следующих критериев.

1. Одинаковое расстояние, определяемое числом остатков, до наиболее точного совпадающего канонического структурного класса человека.

2. Идентичность, по меньшей мере, на 33%, предпочтительно, по меньшей мере, на

50% ключевым аминокислотным остаткам, описанным для соответствующих канонических структурных классов H1 и H2 человека (в целях приведенного выше анализа петли H1 и H2 рассматривают по отдельности и сравнивают каждую из них с наиболее точно совпадающим каноническим структурным классом человека).

5 Приведенный выше анализ основан на предсказании канонической структуры петель H1 и H2 представляющего интерес антитела. Если известны фактические структуры петель H1 и H2 в представляющем интерес антителе, например, согласно данным рентгеновской кристаллографии, петли H1 и H2 в представляющем интерес антителе также могут оцениваться как имеющие каноническую складчатую структуру,  
10 "преимущественно идентичную" канонической складчатой структуре, которая, как известно, встречается в человеческих антителах, если длина петли отличается от длины наиболее точного совпадающего канонического структурного класса человека (обычно на +1 или +2 аминокислоты), но фактическая структура петель H1 и H2 в представляющем интерес антителе совпадает со структурой канонической складки  
15 человека. Ключевые аминокислотные остатки первой и второй гипервариабельных петель VH-доменов (H1 и H2) человека, обнаруженные в канонических структурных классах человека, описаны в работе Chothia и др., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992), содержание которой во всей полноте в порядке ссылки включено в настоящую заявку. В частности, в Таблице 3, которая в порядке ссылки конкретно включена в настоящую  
20 заявку, на странице 802 работы Chothia и др. приведены предпочтительные аминокислотные остатки в ключевых положениях канонических структур H1, обнаруженных в зародышевой линии клеток человека, а в Таблице 4 на стр. 803, которая также в порядке ссылки конкретно включена в настоящую заявку, приведены предпочтительные аминокислотные остатки в ключевых положениях канонических  
25 структур H2 CDR, обнаруженных в зародышевой линии клеток человека. В одном из вариантов осуществления как H1, так и H2 в VH-домене антитела с высокой гомологией белку человека имеют предсказанную или фактическую каноническую складчатую структуру, преимущественно идентичную канонической складчатой структуре, которая встречается в человеческих антителах. Антитела с высокой гомологией белку человека могут содержать VH-домен, в котором гипервариабельные петли H1 и H2 образуют комбинацию канонических складчатых структур, идентичную комбинации канонических структур, которая, как известно, встречается, по меньшей мере, в одном VH-домене зародышевой линии клеток человека. Было замечено, что в VH-доменах, кодируемых зародышевой линией клеток человека, фактически встречаются только определенные  
35 комбинации канонических складчатых структур H1 и H2. В одном из вариантов осуществления H1 и H2 в VH-домене антитела с высокой гомологией белку человека могут быть получены из VH-домена животных помимо человека, но при этом образуют комбинацию предсказанных или фактических канонических складчатых структур, идентичную комбинации канонических структур которая, как известно, встречается в  
40 зародышевой линии клеток человека или VH-домене с соматической мутацией. В неограничивающих вариантах осуществления H1 и H2 в VH-домене антитела с высокой гомологией белку человека могут быть получены из VH-домена животных помимо человека и образуют одну из следующих комбинаций канонических складок: 1-1, 1-2, 1-3, 1-6, 1-4, 2-1, 3-1 и 3-5. Антитело с высокой гомологией белку человека может  
45 содержать VH-домен, имеющий высокую гомологию/идентичность последовательностей последовательностям VH человека и содержащий гипервариабельные петли со структурной гомологией VH человека. Может быть выгодным, чтобы канонические складки, присутствующие в H1 и H2 в VH-домене антитела с высокой гомологией белку

человека, и их комбинация была "правильной" для последовательности зародышевой линии клеток VH человека, наиболее точно совпадающей с VH-доменом антитела с высокой гомологией белку человека с точки зрения общей идентичности первичных аминокислотных последовательностей. В качестве примера, если наиболее точным совпадением последовательностей является совпадение с VH3-доменом зародышевой линии клеток человека, может быть выгодным, чтобы для H1 и H2 образовывали комбинацию канонических складок, которая также встречается в природе VH3-домене человека. Это может быть особенно важным в случае антител с высокой гомологией белку человека, источником которых являются животные помимо человека, например, содержащих VH- и VL-домены антител, производных традиционных верблюжьих антител, в особенности, антител, содержащих гуманизированные верблюжьи VH- и VL-домены. Таким образом, в одном из вариантов осуществления последовательности VH-домена антитела против GPVI с высокой гомологией белку человека могут являться на 70% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более или до 99% или даже на 100% идентичными или гомологичными VH-домену человека на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4, а H1 и H2 в том же антителе получены из VH-домена животных помимо человека, но образуют комбинацию предсказанных или фактических канонических складчатых структур, идентичную комбинации канонических складок, которая, как известно, встречается от природы в таком же VH-домене человека. В других вариантах осуществления петли L1 и L2 в VL-домене антитела с высокой гомологией белку человека получены из VL-домена животных помимо человека и каждая из них имеет предсказанную или фактическую каноническую складчатую структуру, преимущественно идентичную канонической складчатой структуре, которая встречается в человеческих антителах. Как и в VH-доменах, гипервариабельные петли VL-доменов как типа V-лямбда, так и типа V-каппа могут иметь ограниченное число конформаций или канонических структур, частично определяемых по длине, а также по присутствию ключевых аминокислотных остатков в определенных канонических положениях. В пределах представляющего интерес антитела с высокой гомологией белку человека, петли L1, L2 и L3, полученные из VL-домена животных помимо человека, например, животных вида верблюжьих, могут оцениваться как имеющие каноническую складчатую структуру, "преимущественно идентичную" канонической складчатой структуре, которая, как известно, встречается в человеческих антителах при выполнении, по меньшей мере, первого, предпочтительно обоих из следующих критериев.

1. Одинаковое расстояние, определяемое числом остатков, до наиболее точного совпадающего канонического структурного класса человека.
2. Идентичность, по меньшей мере, на 33%, предпочтительно, по меньшей мере, на 50% ключевым аминокислотным остаткам, описанным для соответствующих канонических структурных классов L1 и L2 человека типа V-каппа или V-лямбда (в целях приведенного выше анализа петли L1 и L2 рассматривают по отдельности и сравнивают каждую из них с наиболее точно совпадающим каноническим структурным классом человека). Приведенный выше анализ основан на предсказании канонической структуры петель L1, L2 и L3 представляющего интерес антитела. Если известны фактические структуры петель L1, L2 и L3 в представляющем интерес антителе, например, согласно данным рентгеновской кристаллографии, петли L1, L2 или L3 в представляющем интерес антителе также могут оцениваться как имеющие каноническую складчатую структуру, "преимущественно идентичную" канонической складчатой структуре, которая, как известно, встречается в человеческих антителах, если длина

петли отличается от длины наиболее точного совпадающего канонического структурного класса человека (обычно на +1 или +2 аминокислоты), но фактическая структура петель совпадает со структурой канонической складки человека. Ключевые аминокислотные остатки, обнаруженные в CDR доменов цепей V-лямбда и доменов цепей V-каппа человека в канонических структурных классах человека, описаны у Morea и др. *Methods*, 20: 267-279 (2000) и Martin и др., *J. Mol. Biol.*, 263: 800-815 (1996). Структурный набор домена цепи V-лямбда человека также описан у Tomlinson и др., *EMBO J.* 14: 4628-4638 (1995), а структурный набор домена цепи V-каппа описан у Williams и др., *J. Mol. Biol.*, 264: 220-232 (1996). Содержание всех этих документов в 5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45

порядки ссылки включено в настоящую заявку. L1 и L2 в VL-доме антитела с высокой гомологией белку человека могут образовывать комбинацию предсказанных или фактических канонических складчатых структур, которая идентична комбинации канонических складчатых структур, которые, как известно, встречаются в VL-доме зародышевой линии клеток человека. В неограничивающих вариантах осуществления L1 и L2 в VL-доме антитела с высокой гомологией белку человека могут образовывать одну из следующих комбинаций канонических складок: 11-7, 13-7 (A, B, C), 14-7 (A, B), 12-11, 14-11 и 12-12 (согласно определению Williams и др., *J. Mol. Biol.* 264: 220-32 (1996), представленных на сайте [http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase\\_hVL.html](http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.html)). В неограничивающих вариантах осуществления L1 и L2 в домене V-каппа могут образовывать одну из следующих комбинаций канонических складок: 2-1, 3-1, 4-1 и 6-1 (согласно определению Tomlinson и др., *EMBO J.* 14: 4628-38 (1995), представленных на сайте [http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase\\_hVK.html](http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html)).

В еще одном варианте осуществления все три L1, L2 и L3 в VL-доме антитела с высокой гомологией белку человека могут обладать, преимущественно, присущей человеку структурой. Предпочтительно, чтобы VL-дом антитела с высокой гомологией белку человека имел высокую гомологию/идентичность последовательностям VL-домана человека, а гипервариабельные петли в области VL-домана также имели структурную гомологию VL-доману человека.

В одном из вариантов осуществления последовательности VL-домана антитела против GPVI с высокой гомологией белку человека могут являться на 70% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более или до 99% или даже на 100% идентичными VL-доману человека на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4, а гипервариабельная петля L1 и гипервариабельная петля L2 также могут образовывать комбинацию предсказанных или фактических канонических складчатых структур, идентичных комбинации канонических складок, которая, как известно, встречается от природы в таком VL-домане человека. Разумеется, предусмотрено, что VH-доманы, обладающие высокой гомологией/идентичностью последовательностей VH-доману человека, а также структурной гомологией гипервариабельным петлям VH-домана человека, комбинируются с VL-доманами, обладающими высокой гомологией/идентичностью последовательностей VL-доману человека, а также структурной гомологией гипервариабельными петлям VL-домана человека, с целью получения антител с высокой гомологией белку человека, содержащих попарно связанные VH/VL-доманы с максимальной гомологией последовательностей и структурной гомологией попарно связанным VH/VL-доманам человека, кодируемым зародышевой линией клеток человека.

Иммуноспецифичность, специфичность или специфическое связывание В контексте настоящего изобретения антитело считается "иммуноспецифическим", "специфическим"

или "специфически связывающим" антиген, если оно вступает в реакцию с антигеном на обнаруживаемом уровне, предпочтительно с константой аффинности  $K_A$  около  $10^6$   $M^{-1}$  или более, около  $10^7$   $M^{-1}$  или более, около  $10^8$   $M^{-1}$  или более, около  $1,5 \times 10^8$   $M^{-1}$ ,  
 5 или более, около  $10^9$   $M^{-1}$  или более, около  $5 \times 10^9$   $M^{-1}$  или более. Аффинность антитела его родственному антигену также обычно выражается как константа диссоциации  $K_D$ , и в некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывает антиген, если  $K_D$  составляет  $10^{-6}$  М или менее,  $10^{-7}$  М или менее,  $1,5 \times 10^{-8}$  М или менее,  $10^{-8}$  М  
 10 или менее,  $5 \times 10^{-9}$  М или менее или  $10^{-9}$  М или менее. Аффинность антител может легко определяться обычными методами, например, описанными у Scatchard G и др. (The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 1949, 51: 660-612). Свойства антител связывать антигены, клетки или их ткани обычно могут определяться и оцениваться методами иммунодетекции, включая, например, ELISA, методами  
 15 иммунофлуоресцентного анализа, такими как иммуногистохимия (ИНС) и/или сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS), или поверхностным плазмонным резонансом (SPR, BIAcore).

#### Выделенная нуклеиновая кислота

Используемый термин "выделенная нуклеиновая кислота" означает нуклеиновую  
 20 кислоту, преимущественно отделенную от других последовательностей ДНК генома, а также белков или комплексов, таких как рибосомы и полимеразы, которые в природе сопутствуют нативной последовательности. Термин охватывает последовательность нуклеиновых кислот, которая была извлечена из ее природной среды, и включает  
 25 изоляты и химически синтезированные аналоги рекомбинантных или клонированных ДНК или аналоги, биологически синтезированные гетерологичными системами. Преимущественно чистая нуклеиновая кислота включает выделенные формы нуклеиновой кислоты. Разумеется, это относится к нуклеиновой кислоте в первоначально  
 выделенном виде и не исключает генов или последовательностей, которые позднее  
 вручную добавляются к выделенной нуклеиновой кислоте человеком.

30 Термин "полипептид" используется в его общепринятом значении, т.е. означает последовательность менее 100 аминокислот. Полипептид обычно относится к мономерному объекту. Термин "белок" относится к последовательности более чем 100 аминокислот и/или к мультимерному объекту. Белки согласно изобретению не  
 35 ограничены конкретной длиной продукта. Этот термин не включает пост-экспрессионные модификации белка, например, в результате гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т.п., а также другие известные из техники модификации, как встречающиеся, так и не встречающиеся в природе. Белком может  
 40 являться цельный белок или его подпоследовательность. Конкретными белками, представляющими интерес в контексте настоящего изобретения, являются аминокислотные подпоследовательности, содержащие CDR и способные связывать антиген. "Выделенным белком" является белок, который был идентифицирован, и выделен и/или извлечен из компонента его природной среды. В предпочтительных  
 вариантах осуществления выделенный белок очищают: (1) до достижения концентрации  
 45 более 80, 85, 90, 95% по весу белка, определенного методом Лоури, наиболее предпочтительно более 96, 97, 98 или 99% по весу, (2) до достижения степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающимся  
 стаканом; или (3) до достижения однородности по данным SDS-PAGE в

восстановительных или невосстановительных условиях и с использованием окрашивания голубым кумасси или предпочтительно серебром. Выделенный белок включает белок *in situ* в рекомбинантных клетках ввиду отсутствия, по меньшей мере, одного компонента природной среды антитела. Однако обычно выделенное антитело получают путем, по меньшей мере, одной стадии очистки.

#### Идентичность

Термин "идентичность" или "идентичный", используемый применительно к взаимосвязи между двумя или более аминокислотными последовательностями, означает степень взаимосвязи между аминокислотными последовательностями, определяемой числом совпадений цепочек двух или более аминокислотных остатков. "Идентичность" является показателем процента идентичных совпадений у меньшей из двух или более последовательностей с выравниваниями разрывов (если они существуют), что определяется конкретной математической моделью или компьютерной программой (то есть "алгоритмами"). Идентичность связанных аминокислотных последовательностей может легко рассчитываться известными способами. Такие методы включают без ограничения методы, описанные в *Computational Molecular Biology*, под редакцией Lesk, A.M., издательство Oxford University Press, Нью-Йорк, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, под редакцией Smith, D. W., издательство Academic Press, Нью-Йорк, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, под редакцией Griffin, A.M. и Griffin, H.G., издательство Humana Press, Нью-Джерси, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, под редакцией Gribskov, M. и Devereux, J., издательство M. Stockton Press, Нью-Йорк, 1991; и Carillo и др., *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988). Предпочтительные методы определения идентичности рассчитаны на получение наибольшего совпадения тестируемых последовательностей. Методы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные компьютерные программные методы определения идентичности двух последовательностей включают пакет программ GCG, в том числе GAP (Devereux и др., *Nucl. Acid. Res.* 2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul и др., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). Программа BLASTX общедоступна в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) и других источниках (BLAST Manual, Altschul и др., NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul и др., выше). Для определения идентичности также может использоваться хорошо известный алгоритм Смита-Уотермана.

#### Модифицированное антитело

Используемый термин "модифицированное антитело" означает синтетические формы антител, которые изменены таким образом, что они не встречаются в природе, например антитела, которые содержат, по меньшей мере, две области тяжелой цепи, но не две полные тяжелые цепи (такие как, например, антитела или мини-антитела с удаленными доменами); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), модифицированные с целью связывания двух или более различных антигенов или различных эпитопов в одном антигене; молекулы тяжелой цепи, присоединенные к молекулам scFv и т.п. Молекулы ScFv известны из техники и описаны, например, в патенте US 5892019. Кроме того, термин "модифицированное антитело" означает многовалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.д., антитела, которые связывают три или более копий одного и того же антигена). В другом варианте осуществления модифицированным антителом согласно изобретению является гибридный белок, содержащий, по меньшей мере, одну

область тяжелой цепи, лишенную СН<sub>2</sub>-домена, и содержащую связывающий домен белка, включающий область связывания одного члена из пары рецептор-лиганд.

#### Млекопитающее

Используемый термин "млекопитающее" означает любое млекопитающее, включая людей, сельскохозяйственных животных, а также животных, содержащихся в зоопарках, животных, участвующих в спортивных соревнованиях, или домашних животных, таких как собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, овцы, свиньи, козы, кролики и т.д. Млекопитающим предпочтительно является примат, более предпочтительно человек.

#### Моноклональное антитело

Используемый термин "моноклональное антитело" означает антитело, полученное из популяции преимущественно гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, содержащиеся в популяции, идентичны за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты в антигене. Помимо своей специфичности, моноклональные антитела выгодны тем, что их можно синтезировать без загрязнения другими антителами. Определение "моноклональное" не следует интерпретировать как требующее продуцирования антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применимые в настоящем изобретении, могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler и др., Nature, 256: 495 (1975), или могут методами рекомбинантных ДНК в бактериальных, эукариотических клетках животных или растений (смотри, например, патент US 4816567). "Моноклональные антитела" также могут выделяться из библиотек фаговых антител методами, описанными, например, у Clackson и др., Nature, 352: 624-628 (1991) и Marks и др., J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991).

#### Нативная последовательность

Используемый термин "нуклеотид нативной последовательности" означает полинуклеотид, который имеет такую же нуклеотидную последовательность, как и полинуклеотид природного происхождения. Соответственно, белком "нативной последовательности" является белок, который имеет такую же аминокислотную последовательность, как и белок (например, антитело) природного происхождения (например, от животных любых видов). Такие полинуклеотиды и белки нативной последовательности могут иметь природное происхождение или могут быть получены рекомбинантными или синтетическими методами. Используемый термин полинуклеотидный "вариант" означает полинуклеотид, который обычно отличается от конкретно описанного в изобретении полинуклеотида одной или несколькими заменами, делениями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть синтезированы, например, путем модификации одной или нескольких полинуклеотидных последовательностей согласно изобретению и оценки одного или нескольких показателей биологической активности описанных кодированных белков и/или путем использования любого из ряда методов, хорошо известных из техники. Используемый термин "вариант" белка означает белок, который обычно отличается от конкретно описанного белка одной или несколькими заменами, делениями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть синтезированы, например, путем модификации одной или нескольких белковых

последовательностей согласно изобретению и оценки одного или нескольких показателей биологической активности описанного белка и/или путем использования любого из ряда методов, хорошо известных из техники. В структуру полинуклеотидов и белков согласно настоящему изобретению могут быть внесены модификации с получением при этом функциональной молекулы, которая кодирует вариант или производное белка с желательными характеристиками. Когда желательно изменить аминокислотную последовательность белка, чтобы создать эквивалентный или даже улучшенный вариант или область белка согласно изобретению, специалист в данной области техники обычно изменяет один или несколько кодонов кодирующей последовательности ДНК.

Например, некоторые аминокислоты могут замещаться другими аминокислотами в структуре белка без заметной потери способности связывать другие белки (например, антигены) или клетки. Поскольку биологическая функциональная активность белка определяется именно его связывающей способностью и природой, в последовательности белка и, разумеется, в лежащей в ее основе кодирующей последовательности ДНК могут быть сделаны некоторые замены аминокислотных последовательностей с получением при этом белка со сходными свойствами. Таким образом, предусмотрено, что в аминокислотные последовательности описанных композиций или соответствующие последовательности ДНК, которые кодируют указанные белки, могут вноситься различные изменения без существенной потери их биологической применимости или активности. Во многих случаях вариант белка содержит одну или несколько консервативных замен. "Консервативной заменой" является замена, при которой аминокислота замещена другой аминокислотой со сходными свойствами, в результате чего специалист в области химии пептидов будет ожидать, что вторичная структура и гидропатическая природа белка останутся преимущественно неизменными. Как указано выше, аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и т.п. Примеры замен с учетом некоторых из вышеперечисленных характеристик, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают аргинин и лизин; глутамат и аспарат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин. Аминокислотные замены могут дополнительно осуществляться на основе сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы остатков. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; положительно заряженные аминокислоты включают лизин и аргинин; и аминокислоты с незаряженными полярными головными группами со сходными значениями гидрофильности включают лейцин, изолейцин и валин; глицин и аланин; аспарагин и глутамин; и серин, треонин, фенилаланин и тирозин. Другие группы аминокислот, которые могут содержать консервативные изменения, включают: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; и (5) phe, tyr, trp, his. Вариант также может содержать или, в качестве альтернативы, содержит неконсервативные изменения. В одном из предпочтительных вариантов осуществления варианты белков отличаются от нативной последовательности заменой, делецией или добавлением пяти или менее аминокислот. Варианты также могут (или в качестве альтернативы) быть модифицированы, например, путем делеции или добавления аминокислот, которые оказывают минимальное влияние на иммуногенность, вторичную структуру и гидропатию белка.

Фармацевтически приемлемый эксципиент

Используемый термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" означает любые

растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые препараты, изотонические и задерживающие абсорбцию средства и т.п. Эксципиент не вызывает неблагоприятную, аллергическую или другую нежелательную реакцию при введении животному, предпочтительно человеку. В случае введения человеку препараты

5 должны соответствовать требованиям стерильности, апиrogenности и общим стандартам безопасности и чистоты, установленным регламентирующими органами, такими как, например, FDA или ЕМА.

#### Специфичность

Используемый термин "специфичность" означает способность специфически связывать

10 (например, вступать в иммунную реакцию) заданную мишень, например, GPVI. Белок может являться моносpezifическим и содержать один или несколько сайтов связывания, которые специфически связывают мишень, или белок может являться мультисpezifическим и содержать два или более сайтов связывания, которые специфически связывают одни и те же или различные мишени. В одном из вариантов

15 осуществления антитело согласно изобретению является специфическим в отношении нескольких мишеней. Например, в одном из вариантов осуществления мультисpezifическая связывающая молекула согласно изобретению связывает GPVI и вторую молекулу.

Одноцепочечный Fv также сокращенно sFv или scFv

Используемые термины "одноцепочечные Fv", "sFv" или "scFv" означают фрагменты

20 антител, которые содержат VH- и VL-домены антител, объединенные в одну аминокислотную цепь. Аминокислотная последовательность sFv предпочтительно дополнительно содержит пептидный линкер между VH- и VL-доменами, который позволяет sFv формировать желаемую структуру для связывания антигена. Обзор sFv

25 смотри далее у Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, том 113, под редакцией Rosenberg и Moore, издательство Springer, Нью-Йорк, стр. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995.

#### Субъект

Используемый термин "субъект" означает млекопитающее, предпочтительно

30 человека. В одном из вариантов осуществления субъектом может являться "пациент", то есть теплокровное животное, более предпочтительно человек, который ожидает получения или получает медицинскую помощь или был/является/будет объектом медицинской процедуры или наблюдается на предмет развития заболевания.

#### Синтетический

Используемый термин "синтетический" применительно к белкам включает белки,

35 содержащим аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. Например, не встречающимися в природе белками являются модифицированные формы встречающихся в природе белков (например, содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция) или белки, содержащие первую аминокислотную

40 последовательность (которая необязательно встречается в природе), связанную в линейной последовательности аминокислот со второй аминокислотной последовательностью (которая необязательно встречается в природе), с которой она не связана в природе.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает уровень или количество

45 вещества, которое без значительных отрицательных или неблагоприятных побочных эффектов нацелено на мишень, (1) задерживая или предотвращая начало связанного с GPVI заболевания; (2) замедляя или прекращая прогрессирование, обострение или ухудшение одного или нескольких симптомов связанного с GPVI заболевания; (3)

улучшая симптомы связанного с GPVI заболевания; (4) снижая тяжесть или частоту связанного с GPVI заболевания; или (5) излечивая связанное с GPVI заболевание.

Терапевтически эффективное количество может вводиться до начала связанного с GPVI заболевания с целью профилактики или предотвращения. В качестве альтернативы или  
5 дополнительно терапевтически эффективное количество может вводиться после начала связанного с GPVI заболевания с целью лечения.

Вариабельная область или вариабельный домен

Используемый термин "вариабельный" означает, что некоторые области  
10 вариабельных VH- и VL-доменов имеют значительные различия в последовательностях среди антител и участвуют в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его антигена-мишени. Однако вариабельность неравномерно распределена среди вариабельных доменов антител. Она сосредоточена в трех сегментах, называемых "гипервариабельными петлями", в каждом VL-доме и VH-доме, которые входят в состав антигенсвязывающего сайта. Первая, вторая и третья гипервариабельные петли  
15 домена легкой цепи V-лямбда называются L1( $\lambda$ ), L2( $\lambda$ ) и L3( $\lambda$ ) и могут быть охарактеризованы как содержащие остатки 24-33 (L1( $\lambda$ ), состоящая из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2( $\lambda$ ), состоящая из 3 остатков) и 90-96 (L3( $\lambda$ ), состоящая из 6 остатков) в VL-доме (Morea и др., Methods 20: 267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи V-каппа называются L1  
20 ( $\kappa$ ), L2( $\kappa$ ) и L3( $\kappa$ ) и могут быть охарактеризованы как содержащие остатки 25-33 (L1( $\kappa$ ), состоящая из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2( $\kappa$ ), состоящая из 3 остатков) и 90-97 (L3( $\kappa$ ), состоящая из 6 остатков) в VL-доме (Morea и др., Methods 20: 267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли VH-домена называются H1, H2 и H3 и могут быть охарактеризованы как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящая  
25 из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящая из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, высоковариабельная по длине) в VH-доме (Morea и др., Methods 20: 267-279 (2000)). Если не указано иное, термины L1, L2 и L3, соответственно, относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям VL-домена, включая гипервариабельные петли, полученные из изоформ как V-каппа, так V-лямбда. Термины H1, H2 и H3,  
30 соответственно, относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям VH-домена, включая гипервариабельные петли, полученные из любого из известных изоформ тяжелой цепи, включая гамма, эпсилон, дельта, альфа или мю. Каждая из гипервариабельных петель L1, L2, L3, H1, H2 и H3 может входить в состав "гипервариабельного участка" или "CDR", как описано выше.

35 Валентность

Используемый термин "валентность" относится к числу потенциальных сайтов связывания мишени в белке. Каждый сайт связывания мишени специфически связывает одну молекулу-мишень или конкретную область молекулы-мишени. Когда белок  
40 содержит несколько сайтов связывания мишени, каждый сайт связывания мишени может специфически связывать одни и те же или различные молекулы (например, может связывать различные лиганды или различные антигены или различные эпитопы в одном и том же антигене). Рассматриваемые связывающие молекулы предпочтительно имеют, по меньшей мере, один сайт связывания, специфический в отношении молекулы GPVI человека. Описанные белки предпочтительно являются одновалентными.

45 Лечение или облегчение

Используемые термины "лечение" или "облегчение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупреждающим мерам; при этом задачей является предотвращение или замедление (ослабление) целевого патологического

состояния или нарушения. В число нуждающихся в лечении, входят те, кто уже страдает нарушением, а также те, кто имеет предрасположенность к нарушению, или те, у кого должно быть предотвращено нарушение. У субъекта или млекопитающего успешно "лечат" целевое патологическое состояние или нарушение, если после получения

5 терапевтического количества белка согласно настоящему изобретению у пациента обнаруживается наблюдаемое и/или измеряемое уменьшение или отсутствие одного или нескольких из следующего: уменьшение числа патогенных клеток; уменьшение процента общего числа клеток, которые являются патогенными; и/или облегчение до

10 некоторой степени одного или нескольких симптомов, связанных с конкретным заболеванием или состоянием; снижение заболеваемости и смертности; и повышение качества жизни. Вышеуказанные параметры оценки успешности лечения и положительной динамики заболевания легко поддаются измерению стандартными методами, знакомыми врачам.

Настоящее изобретение относится к выделенным гуманизированным белкам, связывающим GPVI человека, предпочтительно к выделенным гуманизированным антителам против GPVI человека. В одном из вариантов осуществления выделенный белок согласно изобретению является очищенным.

15

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению связывает внеклеточный домен GPVI.

20 В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению связывает Ig-подобный домен 2 типа C2 (D2) GPVI человека.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению связывает эпитоп, содержащий, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-207 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из

25 последовательности, по меньшей мере, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 114-207 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-187,

30 предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-187, более предпочтительно 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 114-187,

35 предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-187, более предпочтительно 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере,

40 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более аминокислотных остатков из аминокислотных остатков 114-187, предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-187, более предпочтительно 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-

45 184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 114-187, предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-

187, более предпочтительно 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

5 В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%,  
10 96%, 97%, 98%, 99% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

15 В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 аминокислотных остатков из аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-  
20 136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) на протяжении аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более  
25 предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-  
30 135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичной на протяжении аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-  
35 135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 аминокислотных  
40 остатков из аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%  
45 на протяжении аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый эпитоп содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 аминокислотных остатка из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления выделенный белок согласно изобретению связывает конформационный эпитоп.

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток GPVI человека.

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток Ig-подобного домена 2 типа C2 (D2) GPVI человека.

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из 114-207 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-187, предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-187, более предпочтительно 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-187, предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-187, более предпочтительно от 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более аминокислотных остатков из аминокислотных остатков 114-187, предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-187, более предпочтительно 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-187, предпочтительно 115-187, более предпочтительно 116-187, более предпочтительно 117-

187, более предпочтительно от 118-186, более предпочтительно 119-185, более предпочтительно 120-184, еще более предпочтительно 121-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

5 В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%,  
10 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно от 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

15 В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 аминокислотных остатков из аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более  
20 предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более  
25 предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более  
30 предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно  
35 117-135, более предпочтительно от 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,  
40 21 аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%,  
45 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 аминокислотных остатка из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%), 98%, 99%) на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит:

по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно от 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70% 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно от 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13); и

по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно от 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит:

по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 аминокислотных остатков из аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно от 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75% 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-142, предпочтительно 115-141, более предпочтительно от 116-140, более предпочтительно 117-139, более предпочтительно 118-138, более предпочтительно 119-137, более предпочтительно 120-136, более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO:

13); и

по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 аминокислотных остатка из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит:

по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно от 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-35, предпочтительно 115-135, более предпочтительно от 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13); и

по меньшей мере, один аминокислотный остаток из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп содержит:

по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 аминокислотных остатка из аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%), 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 114-135, предпочтительно 115-135, более предпочтительно 116-135, более предпочтительно 117-135, более предпочтительно 118-135, более предпочтительно 119-135, более предпочтительно 120-135, еще более предпочтительно 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13); и

по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 аминокислотных остатков из аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или из последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 165-187, предпочтительно 166-186, более предпочтительно 167-185, более предпочтительно 168-184, еще более предпочтительно 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).



Таким образом, в одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению связывает конформационный эпитоп, состоящий из:

аминокислотных остатков 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13); и

аминокислотных остатков 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 169-183 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

В одном из вариантов осуществления упомянутый конформационный эпитоп состоит из:

аминокислотных остатков 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13); и

аминокислотных остатков 169-180 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90, 95, 96, 97, 98, 99% на протяжении аминокислотных остатков 169-180 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

Таким образом, в одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению связывает конформационный эпитоп, состоящий из:

аминокислотных остатков 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% на протяжении аминокислотных остатков 121-135 GPVI человека (SEQ ID NO: 13); и

аминокислотных остатков 169-180 GPVI человека (SEQ ID NO: 13) или последовательности, по меньшей мере, на 60% идентичной, 70%, 75%, 80%, 90, 95, 96, 97, 98, 99% на протяжении аминокислотных остатков 169-180 GPVI человека (SEQ ID NO: 13).

Другой задачей изобретения является создание выделенного белка, связывающего GPVI человека, при этом упомянутый белок имеет  $K_D$  связывания GPVI человека, предпочтительно растворимого GPVI человека, 15 нМ или менее, предпочтительно 10 нМ или менее, более предпочтительно 5 нМ или менее.

В одном из вариантов осуществления выделенный белок согласно изобретению имеет  $k_{off}$  связывания GPVI человека, около  $8 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$  или менее, предпочтительно около  $6 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$  или менее, более предпочтительно около  $4 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$  или менее.

В одном из вариантов осуществления выделенный белок согласно изобретению имеет  $k_{on}$  GPVI человека, по меньшей мере, около  $5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ , предпочтительно, по меньшей мере, около  $5,5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ , более предпочтительно, по меньшей мере, около  $5,9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ , еще более предпочтительно, по меньшей мере, около  $6 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ .

В одном из вариантов осуществления  $K_D$  может определяться путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR, BIAcore) с использованием иммобилизованного растворимого GPVI в дозе от около 700 до около 1600 резонансных единиц (RU) (что

соответствует от около 8,5 до около 11,3 фмоль/мм<sup>2</sup>), предпочтительно от около 850 до около 1200 RU, более предпочтительно от около 950 до около 1075 RU и/или с использованием PBS с рН 7,4 в качестве рабочего буфера и/или с использованием версии 3.0 программного обеспечения BIAevaluation для анализа данных. В одном из вариантов растворимый GPVI соответствует внеклеточному домену GPVI, С-конец которого посредством линкера (такого как, например, линкер Gly-Gly-Arg) слит с последовательностью hFc. Этот растворимый GPVI может именоваться растворимым GPVI-Fc.

Далее описан способ определения аффинности белка согласно изобретению растворимому GPVI.

Анализируют связывание белком согласно изобретению растворимого GPVI человека путем поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы BIAcore 2000 (Уписала, Швеция).

Иммобилизуют растворимый GPVI-Fc в дозе от около 700 до около 1600 RU (что соответствует от около 8,5 до 11,3 фмоль/мм<sup>2</sup>), предпочтительно от около 850 до около 1200 RU, более предпочтительно от около 950 до около 1075 RU и еще более предпочтительно от около 960 до около 1071 RU на микросхеме датчика CM5 карбоксиметилдекстрана методом связывания амина (процедура Wizard). Затем пропускают белок над иммобилизованным GPVI-Fc в PBS с рН 7,4 (10 мМ фосфата, 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, рН 7,42 при 25,4°C) со скоростью 20 мкл/ч при 25°C. Определяют кинетические константы ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и аффинность с использованием версии 3.0 программного обеспечения BIAevaluation путем подгонки данных к связывающей модели. PBS с рН 7,4 является подвижным буфером.

В одном из вариантов осуществления упомянутым белком является молекула антитела, выбранная из группы, включающей цельное антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело, димерное одноцепочечное антитело, Fv, Fab, F(ab)'<sub>2</sub>, дефукозилированное антитело, биспецифическое антитело, диатело, триатело и тетратело.

В другом варианте осуществления упомянутым белком является фрагмент антитела, выбранный из группы, включающей унитело, доменное антитело и нанотело.

В другом варианте осуществления упомянутым белком является антитело-миметик, выбранное из группы, включающей аффинное антитело, аффилин, аффитин, аднектин, атример, эвазин, DARPin, антикалин, авимер, финомер, версатело и дуокалин.

Доменное антитело хорошо известно из области и относится к наименьшим функциональным связывающим единицам антител, соответствующим переменным областям тяжелых или легких цепей антител.

Нанотело хорошо известно из техники и относится к полученному из антитела терапевтическому белку, который имеет уникальные структурные и функциональные свойства встречающихся в природе антител с тяжелыми цепями. Эти антитела с тяжелыми цепями могут содержать один переменный домен (VHH) и два константных домена (CH2 и CH3).

Унитело хорошо известно из техники и относится к фрагменту антитела, у которого отсутствует шарнирная область антител IgG4. Делеция шарнирной области приводит к образованию молекулы преимущественно вдвое меньшего размера, чем традиционные антитела IgG4, которая имеет область одновалентного связывания вместо области двухвалентного связывания антител IgG4.

Аффитело хорошо известно из техники и относится к аффинным белкам на основе

домена белка из 58 аминокислотных остатков, полученного из одного из IgG-связывающих доменов белка А стафилококка.

DARPin (сконструированные белки с анкириновыми повторами) хорошо известны из техники и относятся к антителу-миметику DRP (сконструированному белку с повтором), разработанному с целью использования связывающих способностей белков, не являющихся антителами.

Антикарины хорошо известны из техники и относятся к другой технологии имитации антител, чья специфичность унаследована от липокалинов. Антикарины также могут иметь формат белка с двойным нацеливанием, называемого дуо калином.

Авимеры хорошо известны из техники и относятся к другой технологии имитации антител.

Версатела хорошо известны из техники и относятся к другой технологии имитации антител. Это небольшие белки с молекулярной массой 3-5 кДа и содержанием цистеинов >15%, которые образуют каркас с высокой плотностью дисульфидов вместо гидрофобной сердцевины, которую имеют типичные белки.

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению является одновалентным и предпочтительно выбран из цельного одновалентного антитела, гуманизированного одновалентного антитела, одноцепочечного антитела, Fv, Fab или фрагмента антитела, выбранного из группы, включающей унитело, доменное антитело и нанотело; или из мономерного антитела-миметика, выбранного из группы, включающей аффитело, аффилин, аффитин, аднектин, атример, эвазин, DARPin, антикалин, авимер, финомер и версатело.

В другом варианте осуществления упомянутым белком является иммуноконъюгат, содержащий антитело или его фрагмент, конъюгированный с терапевтическим средством.

В другом варианте осуществления упомянутым белком является конъюгат, содержащий белок согласно изобретению, конъюгированный со средством визуализации. Упомянутый белок может использоваться, например, в приложениях для визуализации.

В одном из вариантов осуществления упомянутым белком является моноклональное антитело.

В другом варианте осуществления упомянутым белком является поликлональное антитело.

Другой задачей изобретения является создание антитела против hGPVI или его антигенсвязывающего фрагмента, в котором переменная область тяжелой цепи содержит, по меньшей мере, один из следующих CDR:

VH-CDR1: GYTFTSYNMH (SEQ ID NO: 1);

VH-CDR2: GIYPGNGDTSYNQKFQG (SEQ ID NO: 2); и

VH-CDR3: GTVVGDWYFDV (SEQ ID NO: 3).

Нумерация и определение CDR приведены согласно Kabat/Chothia.

Другой задачей изобретения является создание антитела против hGPVI или его антигенсвязывающего фрагмента, в котором переменная область легкой цепи содержит, по меньшей мере, один из следующих CDR:

VL-CDR1: RSSQSLENSNGNTYLN (SEQ ID NO: 4);

VL-CDR2: RVSNRFS (SEQ ID NO: 5); и

VL-CDR3: LQLTHVPWT (SEQ ID NO: 6).

Нумерация и определение CDR приведены согласно Kabat/Chothia.

В одном из вариантов осуществления антитело против hGPVI или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит:

по меньшей мере, один из следующих CDR в тяжелой цепи: GYTFTSYNMH (SEQ ID NO: 1), GIYPNGDTSYNQKFQG (SEQ ID NO: 2) и GTVVGDWYFDV (SEQ ID NO: 3) и/или, по меньшей мере, один из следующих CDR в легкой цепи: RSSQSLNSNGNTYLN (SEQ ID NO: 4), RVSNRFS (SEQ ID NO: 5) и LQLTHVPWT (SEQ ID NO: 6).

5 В другом варианте осуществления изобретения в тяжелой цепи антитела против hGPVI или его антигенсвязывающего фрагмента содержатся три CDR: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления изобретения в легкой цепи антитела против hGPVI или его антигенсвязывающего фрагмента содержатся три CDR: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления изобретения в тяжелой цепи антитела против hGPVI или его антигенсвязывающего фрагмента содержатся три CDR: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, а в его легкой цепи содержатся три CDR: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

15 В другом варианте осуществления изобретения в тяжелой цепи антитела против hGPVI или его антигенсвязывающего фрагмента содержатся три CDR: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, а в его легкой цепи содержатся три CDR: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, при этом необязательно, одна, две, три или более аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой

20 аминокислотой.  
Согласно изобретению любой из CDR 1, 2 и 3 тяжелых и легких цепей может быть охарактеризован как имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичную конкретному CDR или наборам CDR, перечисленным в соответствующей SEQ ID NO.

25 В другом варианте осуществления изобретения антитело против hGPVI или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, включающей антитело, имеющее:

(i) CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; и

(ii) CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), содержащие

30 аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно; при этом одна, две, три или более аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть необязательно заменены другой аминокислотой.

В одном из вариантов осуществления антитело против GPVI или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит переменную область

35 тяжелой цепи, содержащую последовательность или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 7.

(SEQ ID NO: 7)

40 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGGIYPG  
NGDTSYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGTVVGDWYFDVWGQ  
GTLVTVSS

В одном из вариантов осуществления антитело против GPVI или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит переменную область

45 легкой цепи, содержащую последовательность или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 8.

(SEQ ID NO: 8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLNSNGNTYLNWYQQKPGKAPKLLIYRVSN  
 RFSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCLQLTHVPWTFGQGTKVEITR

В одном из вариантов осуществления антитело против GPVI или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 9.

(SEQ ID NO: 9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQSLNSNGNTYLNWYQQKPGKAPKLLIYRVSN  
 RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQLTHVPWTFGQGTKVEIKR

В другом варианте осуществления изобретения антитело против GPVI (антитело АСТ017) или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 8.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против GPVI (антитело АСТ006) или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 9.

Согласно изобретению одна, две, три или более аминокислот описанных выше переменных областей тяжелой цепи или переменных областей легкой цепи могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления антитело согласно изобретению содержит переменные области тяжелых и легких цепей, имеющие аминокислотные последовательности, гомологичные аминокислотным последовательностям описанного антитела АСТ017, при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства белка согласно изобретению.

В другом варианте осуществления антитело согласно изобретению содержит переменные области тяжелых и легких цепей, имеющие аминокислотные последовательности, гомологичные аминокислотным последовательностям описанного антитела АСТ006, при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства белка согласно изобретению.

В соответствии с изобретением переменная область тяжелой цепи содержит последовательности, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичные SEQ ID NO: 7.

Согласно изобретению переменная область легкой цепи содержит последовательности, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичные SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

В любом из антител согласно изобретению, например, АСТ017 или АСТ006, указанные последовательности переменных областей и CDR могут содержать консервативные модификации последовательностей. Консервативные модификации последовательностей относятся к модификациям аминокислот, которые не оказывают существенного влияния на связывающие характеристики антитела, содержащего аминокислотную последовательность, или не изменяют их. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации

могут вводиться в антитело согласно изобретению известными из техники стандартными методами, такими как сайт-направленный мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез. Консервативными аминокислотными заменами обычно являются замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со сходными физико-химическими свойствами. Указанные последовательности 5  
вариабельных областей и CDR могут содержать одну, две, три, четыре или более аминокислотных вставок, делеций или замен. Там, где сделаны замены, предпочтительными заменами являются консервативные модификации. Из техники известны семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, 10  
аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серии, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, 15  
фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в областях CDR антитела согласно изобретению могут 20  
заменяться другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененное антитело может проверяться на сохранение функций (т.е. описанных свойств) путем описанных испытаний.

В одном из вариантов осуществления изобретение также предложено антитело, которое связывает преимущественно тот же эпитоп, что и антитело АСТ017 или антитело АСТ006. В настоящем изобретении антитело, которое связывает преимущественно тот же эпитоп, что и антитело АСТ017 или антитело АСТ006, именуется АСТ017-подобным или АСТ006-подобным антителом, соответственно. 25

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела против hGPVI, содержащие VH- и VL-домены или их CDR могут содержать СН1- и/или СL-домены, аминокислотная последовательность которых является полностью или 30  
преимущественно человеческой. Если антигенсвязывающим белком согласно изобретению является антитело, предназначенное для терапевтического применения человеком, вся константная область антитела или, по меньшей мере, ее часть обычно имеет полностью или преимущественно человеческую аминокислотную последовательность. Следовательно, аминокислотная последовательность одной или 35  
нескольких или любой комбинации СН1-домена, шарнирной области, СН2-домена, СН3-домена и СL-домена (и СН4-домена, если он присутствует) может являться полностью или преимущественно человеческой. СН1 -домен, шарнирная область, СН2-домен, СН3-домен и СL-домен (и СН4-домен, если он присутствует) предпочтительно могут иметь полностью или преимущественно человеческую аминокислотную 40  
последовательность. Применительно к константной области гуманизированного или химерного антитела или фрагмента антитела термин "преимущественно человеческая" означает, что аминокислотная последовательность, по меньшей мере, на 70% или, по меньшей мере, на 80% или, по меньшей мере, на 90%, или, по меньшей мере, на 95%, или, по меньшей мере, на 97%, или, по меньшей мере, на 99% идентична константной 45  
области человека. Термин "человеческая аминокислотная последовательность" в этом контексте означает аминокислотную последовательность, которую кодирует ген человеческого иммуноглобулина, который включает гены зародышевой линии, перегруппированные гены и гены с соматической мутацией. В изобретении также

предусмотрены белки, содержащие константные домены человеческой последовательности, которые были изменены путем одного или нескольких добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с человеческой последовательностью, за исключением тех вариантов осуществления, в которых в прямой форме требуется присутствие "полностью человеческой" шарнирной области. Присутствие "полностью человеческой" шарнирной области в антителах против hGPVI согласно изобретению может являться полезным как для сведения к минимуму иммуногенности, так и для оптимизации стабильности антитела. Считается, что в константной области тяжелой и/или легкой цепи, в особенности, в пределах области Fc может быть сделана одна или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций. Аминокислотные замены могут приводить к замене замененной аминокислоты другой природной аминокислотой или не встречающейся в природе или модифицированной аминокислотой. Также допускаются другие структурные модификации, такие как, например, изменения в схеме гликозилирования (например, путем добавления или делеций N- или O-связанных сайтов гликозилирования). В зависимости от предполагаемого применения антитела может быть желательным модифицировать антитело согласно изобретению в том, что касается его связывающих свойств в отношении Fc-рецепторов, например, с целью модуляции эффекторной функции. Например, в Fc-область может вводиться цистеиновый остаток (-ки), что тем самым обеспечивает формирование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную эффекторную функцию. Смотри Caron и др., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, B.J. Immunol. 148: 2918-2922(1992).

Другой задачей изобретения является создание выделенной последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 7. Упомянутой последовательностью нуклеиновых кислот предпочтительно является SEQ ID NO: 10:

(SEQ ID NO: 10)

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGAGCCTCAGTG  
 AAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAG  
 ACAGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGGTATTTATCCAGGAAATGGTGAT  
 ACTTCCTACAATCAGAAGTTCAGGGCCGAGTTACTATGACTCGGGACACTTCCACCTC  
 TACAGTGTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCGGTCTATTACTGT  
 GCAAGAGGCACCGTGGTTCGGCGACTGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAAGGCACCCTGG  
 TCACCGTGAGCAGT

Другой задачей настоящего изобретения является создание выделенной последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей вариабельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 8. Упомянутой последовательностью нуклеиновых кислот предпочтительно является SEQ ID NO: 11:

## (SEQ ID NO: 11)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGA  
 GTGACCATCACCTGTAGAAGTAGTCAGAGCCTTGAGAACAGCAACGGAAACACCTACC  
 TGAATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGAGTTTC  
 CAACCGATTCTCTGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTC  
 ACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCTCCAGCT  
 GACTCATGTCCCATGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAGATCACCCGG

Другой задачей изобретения является создание выделенной последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей вариабельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 9. Упомянутой последовательностью нуклеиновых кислот предпочтительно является SEQ ID NO: 12

## (SEQ ID NO: 12)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGA  
 GTGACCATCACCTGTAGTGCCAGTCAGAGCCTTGAGAACAGCAACGGAAACACCTACC  
 TGAATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGAGTTTC  
 CAACCGATTCTCTGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTC  
 ACCCTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTCCAGCT  
 GACTCATGTCCCATGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAACGC

Другой задачей изобретения является создание вектора экспрессии, содержащего последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитело против GPVI согласно изобретению. В одном из вариантов осуществления вектор экспрессии согласно изобретению содержит, по меньшей мере, одну из последовательностей SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 или любую последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере, на 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичную SEQ ID NO: 10-12.

В одном из вариантов осуществления вектор согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 10 и последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи. Неограничивающим примером последовательности, кодирующей константную область тяжелой цепи, является SEQ ID NO: 14.

## (SEQ ID NO: 14)

GCCTCCACCAAGGGTCCCTCAGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCCTCCAAGAGCACCT  
 CTGGTGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCAGTGAC  
 TGTGTCATGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCTGTCTTGC  
 AGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC  
 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG  
 AAAGTCGAGCCTAAGTCATGCGACAAGACTCAC

В одном из вариантов осуществления вектор согласно изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 и последовательность, кодирующую константную область легкой цепи. Неограничивающим примером последовательности, кодирующей константную область легкой цепи, является SEQ ID

NO: 15.

(SEQ ID NO: 15)

5 ACTGTGGCTGCACCAAGTGTGTTTCATCTTCCCACCTAGCGATGAGCAGTTGAAAT  
 CTGGAACCTGCCTCTGTCGTGTGCCTCCTGAACAACCTTCTACCCACGGGAGGCCAAGGTA  
 CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC  
 AAGATAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACTCTGAGCAAAGCAG  
 10 ACTACGAGAAGCACAAAGGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCCCC  
 TGTCACAAAGAGCTTCAACCGGGGAGAGTGT

В одном из вариантов осуществления вектор согласно изобретению содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие примеры сигнальных пептидных последовательностей включают без ограничения SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17.

(SEQ ID NO: 16)

15 ATGGATATGCGTGTACCAGCTCAACTACTTGGACTTCTATTGCTTTGGCTTCGTGGTGC  
 TAGATGT

20 (SEQ ID NO: 17)

ATGGACTGGACTTGGAGAATCCTATTCTTGGTTGCTGCAGCTACAGGTGCTCATTC

В одном из вариантов осуществления вектор согласно изобретению содержит SEQ ID NO: 10, последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи (такую как, например, SEQ ID NO: 14), и сигнальную пептидную последовательность. Примером такого вектора является вектор, содержащий SEQ ID NO: 18. SEQ ID NO: 18 дополнительно содержит сайты клонирования.

(SEQ ID NO: 18)

30 GCGGCCGCCACCATGGACTGGACTTGGAGAATCCTATTCTTGGTTGCTGCAGCTA  
 CAGGTGCTCATTCACAGGTTTCAGCTGGTTTCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG  
 AGCCTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGC  
 ACTGGGTAAGACAGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGGTATTTATCCAGG  
 35 AAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCCAGGGCCGAGTTACTATGACTCGGGAC  
 ACTTCCACCTCTACAGTGTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCGG  
 TCTATTACTGTGCAAGAGGCACCGTGGTTCGGCGACTGGTACTTCGATGTGTGGGGCCA  
 AGGCACCCTGGTCACCGTGAGCAGTGCCTCCACCAAGGGTCCCTCAGTCTTCCCCTGG  
 40 CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGTGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA  
 CTACTTCCCAGAACCAGTGAAGTGTGTCATGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  
 CACACCTTCCCTGCTGTCTTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC  
 CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC  
 45 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTCGAGCCTAAGTCATGCGACAAGACTCACTGA  
 TGAGGATCC

В одном из вариантов осуществления изобретения вектор согласно изобретению

содержит SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую константную область легкой цепи (например, например, SEQ ID NO: 15), и сигнальную пептидную последовательность. Примером такого вектора является вектор, содержащий SEQ ID NO: 19. SEQ ID NO: 19 дополнительно содержит сайты клонирования.

5

## (SEQ ID NO: 19)

10

15

20

GACGTCACCATGGATATGCGTGTACCAGCTCAACTACTTGGACTTCTATTGCTTTG  
 GCTTCGTGGTGCTAGATGTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCC  
 AGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAAGTAGTCAGAGCCTTGAGAACAGCA  
 ACGGAAACACCTACCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCT  
 GATCTACAGAGTTTCCAACCGATTCTCTGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGT  
 AGCGGTACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCT  
 ACTACTGCCTCCAGCTGACTCATGTCCCATGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGA  
 GATCACCCGGACTGTGGCTGCACCAAGTGTGTTTCATCTTCCCACCTAGCGATGAGCAGT  
 TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTCGTGTGCCTCCTGAACAATTCTACCCACGGGAGGCC  
 AAGGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
 CAGAGCAAGATAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACTCTGAGCA  
 AAGCAGACTACGAGAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
 GTTCCCCTGTACAAAGAGCTTCAACCGGGGAGAGTGTTGATGATATC

25

В одном из вариантов осуществления вектор согласно изобретению содержит SEQ ID NO: 9, последовательность, кодирующую константную область легкой цепи (такую как, например, SEQ ID NO: 15), и сигнальную пептидную последовательность. Примером такого вектора является вектор, содержащий SEQ ID NO: 20. SEQ ID NO: 20 дополнительно содержит сайты клонирования.

30

35

40

45

## (SEQ ID NO: 20)

GACGTCACCATGGATATGCGTGTACCAGCTCAACTACTTGGACTTCTATTGCTTTG  
 GCTTCGTGGTGCTAGATGTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCC  
 AGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGTGCCAGTCAGAGCCTTGAGAACAGCA  
 ACGGAAACACCTACCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCT  
 GATCTACAGAGTTTCCAACCGATTCTCTGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGT  
 AGCGGTACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACTTCGCCACCT  
 ACTACTGCCTCCAGCTGACTCATGTCCCATGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGA  
 GATCAAACGCACTGTGGCTGCACCAAGTGTGTTTCATCTTCCCACCTAGCGATGAGCAGT  
 TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTCGTGTGCCTCCTGAACAATTCTACCCACGGGAGGCC  
 AAGGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
 CAGAGCAAGATAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACTCTGAGCA  
 AAGCAGACTACGAGAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
 GTTCCCCTGTACAAAGAGCTTCAACCGGGGAGAGTGTTGATGATATC

Другой задачей изобретения является создание выделенной клетки-хозяина, содержащей упомянутый вектор. Упомянутая клетка-хозяин может применяться для рекомбинантного продуцирования антител согласно изобретению. В одном из вариантов

осуществления клетками-хозяевами могут являться прокариотные, дрожжевые или эукариотные клетки, предпочтительно клетки млекопитающих, такие как, например, линии CV1 клеток почки обезьяны, трансформированные посредством SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линии эмбриональных клеток почки человека (293 клетки, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)); клетки почки детеныша хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки -DHFR яичника китайского хомячка (CHO, Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); клетки мышей линии Сертоли (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки мышшиной миеломы SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581, ATCC CRL 8287) или NSO (№85110503 в коллекции культур HPA); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3 A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; линия клеток гепатомы человека (Hep G2), а также линия PERC-6 клеток компании DSM. Векторы экспрессии, применимые для использования в каждой из этих клеток-хозяев, также в целом известны из техники. Следует отметить, что термин "клетка-хозяин" обычно относится к линии культивированных клеток. Из определения "клетки-хозяина" в прямой форме исключен организм человека в целом, в который введен вектор экспрессии, кодирующий антигенсвязывающий белок согласно изобретению.

Другой задачей изобретения является создание способа получения антитела против hGPVI или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает культивирование клеток-хозяев, содержащих выделенную полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело против hGPVI, в условиях, применимых для экспрессии антитела против hGPVI, и извлечение антитела против hGPVI после экспрессии. Этот рекомбинантный способ может применяться для крупномасштабного производства антител против hGPVI согласно изобретению, включая моноклональные антитела, предназначенные для применения в терапии, диагностике *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*. Эти способы известны специалистам из техники.

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению может очищаться путем хроматографии, предпочтительно аффинной хроматографии, более предпочтительно аффинной хроматографии на протеин L-агарозе.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению содержит домен связывания белка L (PpL). Способы переноса связывающей PpL активности на белки согласно изобретению описаны у Muzard и др., Analytical Biochemistry 388, 331-338, 2009 и у Lakhri и др., MAbs. 2016; 8 (2): 379-88, которые в порядке ссылки включены в настоящую заявку.

Фрагменты и производные антител согласно настоящему изобретению (согласно термину "антитело" или "антитела", используемому в настоящей заявке, если не указано или из контекста явно не следует иное), предпочтительно АСТ017-подобное или АСТ006-подобное антитело может быть получено известными из техники способами.

"Фрагменты" представляют собой часть интактного антитела, обычно антигенсвязывающего сайта или вариабельной области. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты; диатела; фрагмент любого антитела, которым является белок, имеющий первичную структуру, состоящую из одной непрерывной последовательности смежных аминокислотных остатков (называемой

"фрагментом одноцепочечного антитела" или "одноцепочечным белком"), включая, без ограничения (1) одноцепочечные Fv-молекулы, (2) одноцепочечные белки, содержащие только один переменный домен легкой цепи или его фрагмент, который содержит три CDR переменного домена легкой цепи без соответствующей части тяжелой цепи, и (3) одноцепочечные белки, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи или ее фрагмент, содержащий три CDR переменной области тяжелой цепи без соответствующей части легкой цепи; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты антител согласно настоящему изобретению могут быть получены стандартными способами. Например, Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты могут быть получены путем разложения протеазой выделенных антител в соответствии с общепринятыми методиками. Следует учесть, что иммунореактивные фрагменты могут модифицироваться известными способами; например, с целью замедления клиренса *in vivo* и получения более желательного фармакокинетического профиля фрагмент может модифицироваться полиэтиленгликолем (ПЭГ). Способы связывания и сайт-специфической конъюгации ПЭГ с Fab'-фрагментом описаны, например, у Leong и др., *Cytokines* 16 (3): 106-119 (2001) и Delgado и др., *Br. J. Cancer* 73 (2): 175-187 (1996), содержание которых в порядке ссылки включено в настоящую заявку.

В качестве альтернативы, ДНК, кодирующая антитело согласно изобретению, предпочтительно АСТ017-подобное или АСТ006-подобное антитело может модифицироваться таким образом, чтобы кодировать фрагмент антитела согласно изобретению. Затем модифицированную ДНК вставляют в вектор экспрессии и используют для трансформации или трансфекции соответствующей клетки, которая затем экспрессирует желаемый фрагмент.

Одной из задач изобретения является создание композиции, содержащей, по меньшей мере, один из описанных выше белков согласно изобретению.

Другой задачей изобретения является создание фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, один из описанных выше белков согласно изобретению и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, которые могут использоваться в этих композициях, включают без ограничения ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, частичные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, воды, солей или электролитов, такие как протаминсульфат, динатрийгидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы (например натрийкарбоксиметилцеллюлозу), полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилена и полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Другой задачей изобретения является создание лекарственного средства, содержащего, по меньшей мере, один из описанных выше белков согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления упомянутым белком является антитело против hGPVI или его антигенсвязывающий фрагмент, который ингибирует передачу сигналов GPVI и/или передачу сигналов лиганда GPVI. Используемый термин "ингибировать" означает, что белок способен блокировать, восстанавливать, предотвращать или нейтрализовать взаимодействие GPVI с его лигандами, передачу сигналов GPVI и/или активацию молекул из сигнального пути GPVI.

Примеры лигандов GPVI включают без ограничения, коллаген, фибрин, фибронектин,

витронектин и ламинины.

В одном из вариантов осуществления упомянутым белком является нейтрализующее антитело против hGPVI.

5 В одном из вариантов осуществления упомянутый белок ингибирует связывание GPVI его лиганда (такого как, например, коллаген, фибрин или любой другой лиганд GPVI, способный индуцировать передачу нисходящих сигналов и активацию тромбоцитов).

10 В одном из вариантов осуществления упомянутый белок ингибирует и/или предотвращает агрегацию тромбоцитов в ответ на лиганд GPVI, такой как, например, коллаген. В одном из вариантов осуществления упомянутый белок ингибирует и/или предотвращает адгезию тромбоцитов с лигандом GPVI, таким как, например, коллаген.

15 В одном из вариантов осуществления упомянутый белок ингибирует и/или предотвращает образование GPVI-зависимого тромбина в ответ на лиганд GPVI, такой как, например, фибрин. В одном из вариантов осуществления упомянутый белок ингибирует и/или предотвращает катализируемое тромбоцитами образование тромбина в ответ на коллаген и/или тканевый фактор.

В одном из вариантов осуществления упомянутый белок ингибирует и/или предотвращает рекрутинг тромбоцитов лигандом GPVI (таким как, например, фибрин) посредством GPVI.

20 В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению индуцирует насыщение тромбоцитами цельной крови или богатой тромбоцитами плазмы при их концентрации от около 0,1 до около 10 мкг/мл, предпочтительно от около 0,5 до около 5 мкг/мл и более предпочтительно от около 1 до около 2 мкг/мл (что соответствует от около 2 до 200 нМ, предпочтительно от около 10 до около 100 нМ, более  
25 предпочтительно от около 20 до около 40 нМ).

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению ингибирует индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов при использовании в концентрации, по меньшей мере, около 15 мкг/мл, предпочтительно, по меньшей мере, около 10 мкг/мл, более предпочтительно, по меньшей мере, около 5 мкг/мл. Белок  
30 согласно изобретению предпочтительно полностью ингибирует индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов при использовании в таких концентрациях.

В одном из вариантов осуществления IC50 белка согласно изобретению для ингибирования индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов составляет от около 0,5 до около 10 мкг/мл, предпочтительно от около 1 до около 6 мкг/мл, более  
35 предпочтительно от около 2 до около 3,2 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления концентрация белка согласно изобретению, снижающая на 50% скорость индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов, составляет от около 0,5 до около 5 мкг/мл, предпочтительно от около 1 до около 3 мкг/мл, более предпочтительно около 2 мкг/мл.

40 В одном из вариантов осуществления концентрация белка согласно изобретению, снижающая интенсивность индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов, составляет около 0,5 до около 10 мкг/мл, предпочтительно от около 1 до около 6 мкг/мл, более предпочтительно около 3,2 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению не индуцирует  
45 истощение GPVI при введении *in vivo*, например, в дозе от 0,01 до 500 мг.

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению не индуцирует снижение числа тромбоцитов, то есть тромбоцитопению, при введении *in vivo*, например, в дозе от 0,01 до 500 мг.

Настоящее изобретение также относится к описанным выше белку, композиции, фармацевтической композиции или лекарственному средству для лечения или применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, связанного с GPVI.

5 В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для модуляции взаимодействий между лейкоцитами и тромбоцитами и между тромбоцитами и эндотелием при воспалении и/или тромбозе. Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения воспаления и/или тромбоза.

10 В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для модуляции, предпочтительно для предотвращения агрегации и дегрануляции тромбоцитов.

В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения нарушений, связанных с аномальным или aberrантным мегакариоцитом и/или пролиферацией, дифференцировкой, морфологией, миграцией, агрегацией, дегрануляцией и/или функцией тромбоцитов. Примеры этих нарушений включают без ограничения нарушения свертываемости крови (такие как, например, склонность к кровотечениям и/или высокая длительность кровотечения), такие как тромбоцитопения, такая как, например, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) или иммунная тромбоцитопения.

15 В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения тромботических нарушений (таких как, например, тромботическая окклюзия коронарных артерий), геморрагических нарушений, заболеваний, характеризующихся количественной или качественной дисфункцией тромбоцитов, и заболеваний, характеризующихся дисфункцией эндотелия. Эти заболевания включают без ограничения заболевания коронарных артерий и мозговых артерий.

В другом варианте осуществления описанные выше белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения заболеваний сосудов мозга, включая инсульт и ишемию, тромбозомических заболеваний вен (таких как, например, заболевания, связанные с опуханием, болью и изъязвлением ног, легочная эмболия, абдоминальный венозный тромбоз), тромботической микроангиопатии, сосудистой пурпуры.

20 В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения симптомов, связанных с нарушениями функций и/или заболеваниями тромбоцитов (такими как, например, нарушения свертываемости крови). В частности, описанные выше белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство, могут использоваться для модуляции симптомов, связанных с ИТП, таких как пурпура и серьезные нарушения свертываемости крови.

35 В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения заболеваний коронарных артерий (таких как, например, сердечнососудистые заболевания, включая нестабильную стенокардию, инфаркт миокарда, острый инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, реваскуляризация коронарных артерий, рестеноз коронарных артерий, тромбоз эмболия желудочков, атеросклероз, болезнь коронарных артерий (например, окклюзионные поражения артерий), образование бляшек, сердечная ишемия, включая осложнения, связанные с процедурами коронарного шунтирования, такими как

чрескожная ангиопластика коронарных артерий (баллонная ангиопластика)). Что касается коронарных процедур, такое лечение может осуществляться путем введения белка согласно изобретению до, во время или после процедуры. В одном из предпочтительных вариантов осуществления такое введение может использоваться для предотвращения острой сердечной ишемии после ангиопластики.

В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения нарушений, возникающих в результате любого поражения кровеносных сосудов, которое может приводить к агрегации тромбоцитов. Такие поражения кровеносных сосудов включают без ограничения повреждение стенок сосудов, такие как повреждения сосудов, которые приводят к образованию открытой высокотромбогенной поверхности внутри в остальном неповрежденного кровеносного сосуда, например, повреждения стенок сосудов, приводящие к высвобождению ADP, тромбина и/или адреналина, напряжение сдвига жидкости, которое возникает в месте сужения, трещин и/или разрывов сосудов на участках атеросклеротических бляшек, и травмы возникающие в результате баллонной ангиопластики или атерэктомии.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы белок согласно изобретению не влиял на другие признаки или функции тромбоцитов, такие как индуцированное агонистами изменение формы тромбоцитов (например, опосредованная GPIIb-vWF активация тромбоцитов), высвобождение содержимого гранул тромбоцитов, активация путей сигнальной трансдукции или индукция мобилизации кальция при активации тромбоцитов агонистами, которые не взаимодействуют с GPVI.

В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения нарушений, связанных с aberrантной сигнальной трансдукцией в ответ на лиганды GPVI (включая без ограничения коллаген, фибрин, фибронектин, витронектин и ламинины) или другие белки внеклеточного матрикса.

В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения нарушений, связанных с aberrантными уровнями экспрессии и/или активности GPVI в клетках, которые нормально экспрессируют GPVI, или в клетках, которые не экспрессируют GPVI. Например, белок согласно изобретению может использоваться для модуляции нарушений, связанных с aberrантной экспрессией GPVI в раковых (например, опухолевых) клетках, которые нормально не экспрессируют GPVI. Такие нарушения могут включать, например, нарушения, которые связаны с миграцией и метастазированием опухолевых клеток.

В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для модуляции иммунорегуляторных функций тромбоцитов.

В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения заболеваний печени, костного мозга и периферической крови.

В другом варианте осуществления описанные белок, композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство используются для лечения нарушений, которым способствуют тромбоциты путем модуляции воспалительных реакций, включая без ограничения длительное или продолжительное воспаление, связанное с инфекцией, артритом, фиброзом или нарушениями, при которых тромбоциты модулируют функции

клеток, включая без ограничения пролиферацию и/или распространение раковых клеток.

Другие примеры заболеваний, нарушений или состояний, связанных с GPVI, включают без ограничения сердечнососудистые заболевания и/или сердечнососудистые события, такие как, например, артериальный тромбоз, включая атеротромбоз, ишемические события, острый коронарный синдром, инфаркт миокарда (сердечный приступ), острую ишемию головного мозга (инсульт), чрескожное коронарное вмешательство, тромбоз стента, ишемический рестеноз, ишемию (острую и хроническую), заболевания аорты и ее ветвей (такие как аневризма аорты, тромбоз), болезнь периферических артерий, венозный тромбоз, острый флебит и легочную эмболию, связанный с раком тромбоз (симптом Труссо), воспалительный тромбоз и тромбоз, связанный с инфекцией.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция или лекарственное средство согласно изобретению предназначено для лечения или для применения при лечении артериального или венозного тромбоза, рестеноза, острого коронарного синдрома или нарушений мозгового кровообращения вследствие атеросклероза, предпочтительно тромбоза.

Другой задачей изобретения является создание способа лечения заболевания, нарушения или состояния, связанного с GPVI, включающего введение нуждающемуся в этом субъекту белка, композиции, фармацевтической композиции или лекарственного средства согласно настоящему изобретению.

Нуждающемуся в этом субъекту предпочтительно вводят терапевтически эффективное количество белка согласно изобретению.

Ясно, что общая суточная дозировка белка согласно изобретению, композиции, фармацевтической композиции или лекарственного средства согласно настоящему изобретению определяется лечащим врачом на основании обоснованного медицинского заключения. Конкретная терапевтически эффективная величина дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая тип заболевания и его тяжесть; активность конкретного используемого белка; конкретную применяемую композицию, возраст, вес тела, общее состояние здоровья, пол и рацион субъекта; время введения, способ введения и скорость экскреции конкретного применяемого белка; продолжительность лечения; лекарства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым белком; и подобные факторы, хорошо известные в медицине. Например, хорошо известно, что следует начинать с введения меньших доз соединения, чем требуются для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта.

Однако суточная дозировка белка может варьировать в широких пределах от 0,01 до 500 мг в сутки для взрослого человека. Композиции предпочтительно содержат около 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мг активного ингредиента для симптоматической корректировки дозировки для подлежащего лечению пациента. Лекарственный препарат обычно содержит от около 0,01 мг до около 1000 мг активного ингредиента, предпочтительно от 1 мг до около 500 мг активного ингредиента.

В одном из вариантов осуществления субъект страдает, предпочтительно у субъекта диагностировано заболевание, нарушение или состояние, связанное с GPVI, предпочтительно с сердечнососудистым заболеванием и/или событием.

В другом варианте осуществления субъект подвержен риску развития заболевания, нарушения или состояния, связанного с GPVI, предпочтительно сердечнососудистого заболевания и/или события. Примеры факторов риска включают без ограничения семейную историю (такую как, например, генетическая предрасположенность),

этническую принадлежность, возраст, воздействие табака, высокое кровяное давление (гипертонию), высокий уровень холестерина, ожирение, физическую инертность, диабет (в частности диабет 2 типа), нездоровую пищу и вред от употребления алкоголя.

В случае применения для введения субъекту композиция будет составлена для введения субъекту. Композиции согласно настоящему изобретению могут вводиться парентерально, с помощью ингаляционного аэрозоля, ректально, назально или через имплантированный резервуар. Используемый термин "введение" включает подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, внутрисиновиальную, интрастернальную, внутриоболочечную, внутripеченочную, внутрираневую и внутрочерепную инъекцию или методы инфузии. Примеры форм, приспособленных для инъекции, включают без ограничения растворы, такие как, например, стерильные водные растворы, гели, дисперсии, эмульсии, суспензии, твердые формы, применимые для приготовления растворов или суспензий путем добавления жидкости перед использованием, такие как, например, порошок, липосомальные формы и т.п.

Стерильные инъекционные формы композиций согласно настоящему изобретению могут представлять собой водную или маслянистую суспензию. Эти суспензии могут состояться известными из техники способами с использованием применимых диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Стерильным препаратом для инъекций также может являться стерильный раствор или суспензия для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе. В число приемлемых носителей и растворителей, которые могут использоваться, входят вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно используют стерильные, нелетучие масла. В этих целях может использоваться любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Для приготовления инъекционных материалов могут применяться жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, а также натуральные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно, в их полиоксиэтилированных формах. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать длинноцепочечный спиртовой разбавитель или диспергатор, такой как карбоксиметилцеллюлоза или аналогичные диспергирующие средства, которые обычно используются в составе фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. В целях приготовления составов также могут использоваться другие распространенные поверхностно-активные вещества, такие как Tweens, Spans, и другие эмульгаторы или усилители биодоступности, которые широко применяются при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм.

Режимы введения и дозировки белка в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению могут определяться известными для этих продуктов способами, например, в соответствии с указаниями производителей. Например, белок, присутствующий в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, может поставляться в концентрации от около 1 до около 100 мг/мл, такой как, например, 1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл или 100 мг/мл. В одном из вариантов осуществления белок поставляется в концентрации около 10 мг/мл в одноразовых пробирках по 100 мг (10 мл) или 500 мг (50 мл). В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать белок согласно изобретению в PBS с pH 7,2-7,7. Следует учесть, что эти режимы являются примерами, и что оптимальный график и режим могут адаптироваться с учетом аффинности и

переносимости конкретного антитела в фармацевтической композиции, что должно определяться при клинических испытаниях.

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению может использоваться *in vitro* или *in vivo* с целью идентификации образцов, тканей, органов или клеток, которые экспрессируют GPVI.

Примеры исследований, в которых может использоваться белок согласно изобретению, включают без ограничения, ELISA, ELISA методом двойных антител, RIA, FACS, тканевую иммуногистохимию, вестерн-блоттинг и иммунопреципитацию.

В одном из вариантов осуществления образцом является биологический образец. Примеры биологических образцов включают без ограничения физиологические жидкости, предпочтительно кровь, более предпочтительно сыворотку крови, плазму, синовиальную жидкость, бронхоальвеолярную промывную жидкость, мокроту, лимфу, асцитические жидкости, мочу, амниотическую жидкость, жидкость брюшной полости, спинномозговую жидкость, плевральную жидкость, перикардальную жидкость и альвеолярные макрофаги, тканевые лизаты, биоптаты и экстракты, полученные из пораженных тканей.

В одном из вариантов осуществления термином "образец" обозначается образец, взятый у человека перед любым анализом.

В другом варианте осуществления белок согласно изобретению может помечаться в целях диагностики или обнаружения. Мечение означает, что соединение имеет, по меньшей мере, один присоединенный элемент, изотоп или химическое соединение для обеспечения обнаружения соединения. Примеры меток включают без ограничения изотопные метки, такие как радиоактивные или тяжелые изотопы; магнитные, электрические или термические метки и цветные или люминесцентные красители.

Примеры люминесцентных красителей включают без ограничения комплексы лантаноидов, квантовые точки, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метил-кумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, желтый Люцифер, синий Cascade, красный Texas, красители Alexa и цианиновые красители.

Другой задачей изобретения является создание набора, содержащего, по меньшей мере, один белок согласно изобретению.

Под "набором" подразумевается любое изделие (например, упаковка или контейнер), содержащее, по меньшей мере, один реагент, то есть, например, антитело для специфического обнаружения экспрессии GPVI. Набор может предлагаться, поставляться или продаваться в виде комплекта для осуществления способов согласно настоящему изобретению. Кроме того, любые или все реагенты набора могут поставляться в контейнерах, которые защищают их от внешней среды, например, в герметичных контейнерах. Наборы могут также содержать листовку-вкладыш, описывающую набор и способы его использования.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования функции рецептора GPVI и передачи нисходящих сигналов с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления способ ингибирования функции рецептора GPVI и передачи нисходящих сигналов не влияет на количество тромбоцитов, экспрессию GPVI на поверхности тромбоцитов и длительность кровотечения.

В одном из вариантов осуществления способ ингибирования функции рецептора GPVI и передачи нисходящих сигналов является эффективным и обратимым.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования связывания GPVI

его лигандов (предпочтительно, но не исключительно коллагена) с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

5 В одном из вариантов осуществления способ ингибирования связывания GPVI его лигандов не влияет на количество тромбоцитов, экспрессию GPVI на поверхности тромбоцитов и длительность кровотечения.

В одном из вариантов осуществления способ ингибирования связывания GPVI его лигандов является эффективным и обратимым.

10 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования и/или предотвращения адгезии тромбоцитов и коллагена с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

15 Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования и/или предотвращения индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

20 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования и/или предотвращения активации тромбоцитов, в частности агрегации тромбоцитов, в ответ на коллаген с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

25 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования и/или предотвращения образования тромбина в ответ на коллаген и/или тканевой фактор с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

30 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования связывания GPVI фибрина с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

35 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования и/или предотвращения рекрутинга тромбоцитов фибрином посредством GPVI с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

40 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования и/или предотвращения GPVI-зависимого образования тромбина в ответ на фибрин с целью лечения тем самым связанного с GPVI состояния, при этом упомянутый способ включает введение субъекту белка согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления введение белка согласно изобретению субъекту не вызывает истощения GPVI *in vivo*.

45 В одном из вариантов осуществления введение белка согласно изобретению субъекту не вызывает снижения количества тромбоцитов. Таким образом, в одном из вариантов осуществления введение белка согласно изобретению субъекту не вызывает тромбоцитопению.

В одном из вариантов осуществления введение белка согласно изобретению субъекту не вызывает увеличения времени кровотечения.

45 В одном из вариантов осуществления способ согласно изобретению включает введение субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно изобретению.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 проиллюстрирована фотография окрашенного голубым кумасси геля, на

которой показан белок согласно изобретению. ММ: маркер молекулярной массы, FT: поток через фракцию, РХ: очищенный белок (элюированный из колонки с протеин L-агарозой); СМ: кондиционированная среда для культивирования.

5 На фиг. 2 показан собой график, иллюстрирующий изотермические кривые связывания двух гуманизированных Fab согласно изобретению. Поместили очищенный GPVI-Fc на микротитрационные планшеты и добавляли очищенные белки в возрастающих концентрациях. После промывания обнаружили связанные белки с использованием конъюгированного со щелочной фосфатазой специфического антитела к Fab-фрагменту человека, и измерили гидролиз субстрата щелочной фосфатазы на волне 485 нм.

10 На фиг. 3 показана кривая, построенная по результатам проточной цитометрии с использованием конъюгированного с Alexa488 антитела АСТ017. Конъюгировали АСТ017 с А488 в соответствии с указаниями производителя. Добавляли конъюгат А488-АСТ0017 в возрастающих концентрациях в предохраненную от свертывания цельную кровь или богатую тромбоцитами плазму, полученную от здорового добровольца. 15 Через 20 мин выдерживания при комнатной температуре разбавили образцы и немедленно подвергли анализу методом проточной цитометрии. Представлена средняя флуоресценция тромбоцитов в зависимости от концентрации АСТ017, конъюгированного с А488. Представлены данные из одного из трех репрезентативных экспериментов.

На фиг. 4 показана кривая, иллюстрирующая агрегацию тромбоцитов, измеренную 20 в богатой тромбоцитами плазме (PRP). В течение 10 минут предварительно инкубировали PRP с очищенным АСТ017 в возрастающих концентрациях при 37°C без перемешивания до иницирования агрегации тромбоцитов коллагеном ( $1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ). Продолжили инкубацию пролонгировали при 37°C с перемешиванием и непрерывной регистрацией изменений в пропускании света. Представлены данные одного из трех репрезентативных 25 экспериментов.

На фиг. 5 показан график, иллюстрирующий способность АСТ017 ингибировать индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов, количественно определяемую по скорости и интенсивности отклика. Измерили интенсивность и скорость агрегации 30 тромбоцитов при каждой концентрации АСТ017. Рассчитали остаточные отклики как соотношение откликов в присутствии и в отсутствие АСТ017  $\times 100$  и нанесли на график в зависимости от концентрации АСТ017 с использованием кривой нелинейной регрессии успешности конкурирования (логарифм (ингибитор) относительного отклика) (три параметра) из программного обеспечения Graph Pad Prism (5.0). Представлены кривые из одного из трех репрезентативных экспериментов.

35 На фиг. 6 показана комбинация графиков, иллюстрирующих индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов. Зарегистрирована максимальная степень агрегации тромбоцитов, вызванной добавлением коллагена ( $1 \text{ мкг/мл}$ ) в богатую тромбоцитами плазму (PRP) мышей, получавших носитель или возрастающие дозы АСТ017.

40 На фиг. 7 показана комбинация графиков, иллюстрирующих экспрессию GPVI в тромбоцитах. Инкубировали кровь, полученную до инъекции и через 30 мин после инъекции носителя или возрастающих доз АСТ017, с конъюгированным с FITC моноклональным антителом 3J24 против GPVI. Левая панель: средняя флуоресценция тромбоцитов мышей, получавших носитель ( $0 \text{ мг/кг}$  АСТ017) или АСТ017 в различных дозах. Средняя и правая панели: эволюция экспрессии GPVI у отдельных животных, 45 получавших носитель или АСТ017 ( $4 \text{ мг/кг}$ ) с момента до инъекции до момента через 30 минут после инъекции.

На фиг. 8 показан график, иллюстрирующий количество тромбоцитов в крови мышей после введения АСТ017 ( $4 \text{ мг/кг}$ ) или носителя ( $0 \text{ мг/кг}$  АСТ017).

На фиг. 9 показана комбинация графиков, иллюстрирующих длительность кровотечения (А) и потерю крови (В) у мышей через 30 мин после введения носителя (Ctrl), АСТ017 (4 мг/кг) или клопидогреля, антагониста аденозиндифосфатного рецептора P2Y<sub>12</sub> в тромбоцитах (10 мг/кг).

5 На фиг. 10 показана комбинация графиков, иллюстрирующих среднюю интенсивность  $\pm$  стандартная ошибка средней величины (SEM) (А) и скорость (В) индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов, измеренную через 30 минут и через 2 часа после окончания 15-минутного вливания возрастающих доз АСТ017 (1, 2, 4, 8 мг/кг) яванским макакам (n=4).

10 На фиг. 11 показано количество тромбоцитов у яванских макаков, измеренное до любого лечения (время = 0) или через 24 часа после вливания им носителя или АСТ017 в возрастающих дозах (1, 2, 4, 8 мг/кг).

На фиг. 12 показана комбинация графиков, иллюстрирующих длительность кровотечения, измеренное у 4 субъектов до лечения (время = 0) и через 30 мин и через 15 2 часа после вливания АСТ017 (1, 2, 4, 8 мг/кг) или носителя яванским макакам.

На фиг. 13 показана комбинация графиков, иллюстрирующих среднюю интенсивность  $\pm$  стандартное отклонение (SD) (А) и скорость (В) индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов, измеренную в различное время после начала одночасового вливания 15 двух доз АСТ017 (2 и 8 мг/кг) яванским макакам (n=8).

20 На фиг. 14 показан график, иллюстрирующий уровень экспрессии GPVI, измеренный методом проточной цитометрии, в тромбоцитах яванских макаков (n=8) в различное время после начала одночасового вливания АСТ017 в дозе 2 мг/кг (MFI: средняя интенсивность флуоресценции).

#### Примеры

25 Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами.

#### Пример 1. Получение АСТ017 и АСТ006

Получили антитела АСТ017 и АСТ006 (Fab-фрагменты) в линии клеток CHO-S (Invitrogen) методом переходной трансфекции в стандартных условиях в соответствии с указаниями производителя.

30 Непосредственно перед трансфекцией расщепили и выселили клетки CHO-S в 10 мл не содержащей сыворотки среды для выращивания с плотностью  $0,5-1,0 \times 10^6$  клеток/мл. Затем трансфицировали клетки вектором, содержащим последовательность, кодирующую легкую цепь и тяжелую цепь антитела согласно изобретению. Извлекли супернатанты культур через 4-5 дней после трансфекции, когда жизнеспособность 35 клеток составляла менее 80%.

В случае АСТ017 трансфицировали клетки с использованием вектора, содержащего SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 18, при этом SEQ ID NO: 19 содержит последовательности, кодирующие константную и переменные области легкой цепи АСТ017, слитые с 40 сигнальной пептидной последовательностью, и клонирующие сайты, а SEQ ID NO: 18 содержит последовательности, кодирующие константные и переменные области тяжелой цепи АСТ017, слитые с сигнальной пептидной последовательностью, и сайты клонирования.

В случае АСТ006 трансфицировали клетки с использованием вектора, содержащего 45 SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 18, при этом SEQ ID NO: 20 содержит последовательности, кодирующие константные и переменные области легкой цепи АСТ006, слитые с сигнальной пептидной последовательностью, и сайты клонирования, а SEQ ID NO: 18 содержит последовательности, кодирующие константные и переменные области тяжелой цепи АСТ006, слитые с сигнальной пептидной последовательностью, и сайты

клонирования.

С целью очистки поместили кондиционированную среду клеток, подвергнутую переходной трансфекции посредством кДНК гуманизированного Fab, в колонку с протеин L-агарозой (протеин L-агароза PIERCE, номер по каталогу 20510017) в соответствии с указаниями производителя. Элюировали Fab с использованием 0,1 М глицина с рН 2,5 и фракций, собранных на 1 М Tris с рН 11, чтобы нейтрализовать рН. После диализа на PBS определили концентрацию Fab путем измерения спектральной поглотительной способности на волнах 280 нм и 320 нм с поправкой на светорассеяние и путем использования значения 1,5 спектральной поглотительной способности, 10 определенного согласно последовательности, для 0,1% растворов ( $A_{280\text{нм}}^{0,1\%}$ ). Концентрация белка была подтверждена методом ВСА. Оценили чистоту Fab на основании окрашивания SDS-PAGE и голубым кумасси.

Как показано на фиг. 1, в невозстанавливающих условиях очищенное гуманизированное Fab мигрировало как основная полоса с молекулярной массой 42 кДа в соответствии со своей аминокислотной последовательностью. После восстановления дисульфидного мостика наблюдался дублет с молекулярной массой 23-24 кДа, соответствующий тяжелой и легкой цепям.

Пример 2. Связывание GPVI-Fc

Получили растворимый GPVI-Fc следующим образом: подвергли рамку открытого считывания предсказанного внеклеточного домена GPVI ПЦР-амплификации из последовательности Козака до первого метионина в аспарагин 269 непосредственно перед предсказанной трансмембранной последовательностью. Лигировали ПЦР-фрагмент в вектор-хозяин pCDM8, содержащий геномную последовательность Fc-домена человеческого IgG1, в результате чего внеклеточная часть на С-конце кДНК hGPVI слилась посредством 3-аланинового линкера с hFc-последовательностью. Трансфицировали секвенированную ДНК-конструкцию в клетки НЕК 293Т. Очистили GPVI-Fc от кондиционированной среды клеток путем аффинной хроматографии на протеин А-агарозе в соответствии с указаниями производителя.

Поместили GPVI-Fc в PBS (2 мкг/мл, 100 на лунку) на микротитрационные планшеты и выдержали в течение ночи при 4°C. В течение 120 минут насытили неспецифические сайты связывания 100 мкл 1% BSA в PBS. Затем в течение 120 минут инкубировали планшеты при возрастающей концентрации препаратов антител (100 мкл в PBS, содержащем 0,1% BSA и 0,1% Tween 20). После 4 циклов промывания в течение 120 минут инкубировали планшеты с конъюгированным со щелочной фосфатазой мышинным антителом против человеческого Fab (100 мкл в PBS, содержащем 0,1% BSA и 0,1% Tween 20). Наконец, в течение 5 минут добавили в каждую лунку 100 раствора субстрата (паранитрофенилфосфата), и остановили колориметрическую реакцию с помощью 25 мкл 3 М NaOH перед считыванием спектральной поглотительной способности на волне 405 нм. В качестве альтернативы, обнаружили связанные антителами GPVI с использованием конъюгированного с пероксидазой L-белка, и О-фенилендиаминдигидрохлорида (OPD) в качестве субстрата, после осуществили считывание на волне 485 нм.

На фиг. 2 показаны изотермические кривые связывания двумя гуманизированными Fab согласно изобретению иммобилизованного GPVI-Fc. Анализ кривых позволил вычислить константу полунасыщения 1 нМ для АСТ006 и 0,5 нМ для АСТ017.

Пример 3. Поверхностный плазмонный резонанс (BIAcore)

Проанализировали связывание АСТ017, АСТ006 и Fab 9012 растворимого GPVI человека методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы

ВIAcore 2000 (Уппсала, Швеция).

Иммобилизовали растворимый GPVI-Fc (полученный, как описано в примере 2) в ацетатном 10 мМ буфера с pH 6 в дозе 960-1071 RU (что соответствует около 6,4-7,15 фмоль/мм<sup>2</sup>) на микросхеме датчика CM5 карбокси-метилдекстрана методом связывания амина (процедура Wizard). Затем пропустили белок над иммобилизованным GPVI-Fc в PBS с pH 7,4 (10 мМ фосфата, 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,42 при 25,4°C) со скоростью 20 мкл/ч при 25°C. Определили кинетические константы ( $K_A$ ,  $K_D$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и аффинность с использованием версии 3.0 программного обеспечения VIAevaluation путем подгонки данных к связывающей модели. PBS с pH 7,4 является подвижным буфером.

Результаты приведены в Таблице 1.

Таблица 1

	ACT017	ACT006	mFab 9012
$k_{on}$ (М <sup>-1</sup> ·сек <sup>-1</sup> )	$5,97 \cdot 10^4$	$6,65 \cdot 10^4$	$4,96 \cdot 10^4$
$k_{off}$ (сек <sup>-1</sup> )	$2,32 \cdot 10^{-4}$	$4,76 \cdot 10^{-4}$	$8,58 \cdot 10^{-4}$
$K_A$ (М <sup>-1</sup> )	$2,57 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$
$K_D$ (нМ)	4,1 (±0,28)	7,3 (±0,24)	17,03 (±0,73)

Таким образом, антитела согласно изобретению (ACT017 и ACT006) обладают повышенной аффинностью растворимому GPVI по сравнению с моноклональным Fab 9012, который описан в предшествующем уровне техники и исследован в таких же экспериментальных условиях.

#### Пример 4

Биологические данные

Материалы и методы

Тромбоциты человека

Путем венопункции собрали кровь здоровых добровольцев, не принимавших медикаменты в течение 10 дней, в шприцы с 3,2% цитратом натрия (Vacutainer Beckton Dickinson, Ле-Пон-де-Кле, Франция). Все доноры крови дали добровольное и информированное письменное согласие на участие в этом исследовании, что соответствует этическим стандартам Хельсинкской Декларации.

Потоковая цитометрия

Конъюгировали гуманизированный Fab ACT017 с Alexa488 (Molecular Probes) в соответствии с рекомендацией производителя. Осуществили разделение с использованием набора для очистки конъюгированных антител (Molecular Probes), и определили концентрацию на волнах 280 и 494 нм. В течение 20 минут инкубировали при комнатной температуре в темноте конъюгированный с A488 гуманизированный Fab в различных концентрациях с тромбоцитами человека в цельной крови или богатой тромбоцитами плазме. После разбавления в PBS проанализировали клетки в проточном цитометре с сортировкой клеток с возбуждением флуоресценции (FACS LSR II BD).

Агрегация тромбоцитов

Получили богатую тромбоцитами плазму (PRP) после центрифугирования (120×g, 15 минут; 20°C) и немедленно использовали. С помощью агрегатора АРАСТ® измерили агрегацию тромбоцитов, которую инициировали путем добавления 1 мкг·мл<sup>-1</sup> коллагена типа I (Norm collagen, Nycomed, Германия) в PRP, содержащий различные концентрации

гуманизированного Fab, с непрерывной регистрацией. Измерили скорость и интенсивность агрегации.

#### Гуманизированные GPVI мыши

Создали мутантную линию мышей с выключенным геном *gp6*, как сообщалось ранее, путем введения последовательности гена *gp6* человека в экзон 1 в АТГ мышинового гена *gp6* (Mangin P и др., Humanized Glycoprotein VI (GPVI) Mouse Model to Assess the Antithrombotic Efficacies of Anti-GPVI Agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 341(1): 156-63. doi: 10.1124/jpet.111.189050. Epub 2012, Jan 11). Мыши являлись жизнеспособными и способными к размножению и не имели каких-либо гематологических дефектов. На поверхности тромбоцитов было обнаружено приблизительно 3700 копий GPVI человека.

#### Количество тромбоцитов

Собрали цельную кровь в шприцы с ЭДТА (6 мМ) после рассечения хвоста мышей. Определили количество тромбоцитов с помощью ветеринарного гематологического анализатора SCIL Vet abc™ (компании Scil Animal Care, Ольтсайм, Франция), настроенного на параметры мышей.

#### Агрегация тромбоцитов Ex vivo

Собирали кровь в шприцы с цитратом натрия до инъекции и через 30 минут после инъекции возрастающих доз АСТ017 или эквивалентного объема носителя и PRP, полученной центрифугированием. Скорректировали количество тромбоцитов до  $300 \cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$ , и непрерывно регистрировали агрегацию тромбоцитов, инициированную с помощью  $1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  коллагена типа I, в четырехканальном агрегаторе CARAT TX4.

#### Экспрессия GPVI

Собрали образцы крови в шприцы с ЭДТА до инъекции и через 30 минут после инъекции возрастающих доз АСТ017 или эквивалентного объема носителя и инкубировали с конъюгированным с FITC моноклональным антителом 3J24 против GPVI ( $10 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ), которое распознает GPVI человека в эпитопе, отличающемся от эпитопа АСТ017, и измерили флуоресценцию на цитометре Beckman Coulter Gallios Flow.

#### Длительность кровотечения из хвоста и потеря крови

Перерезали конец хвоста анестезированных мышей скальпелем в поперечном направлении (3 мм) и сразу погрузили в пробирку с 13 мл 0,9-процентного изотонического физиологического раствора при температуре 37°C. В течение 30 минут наблюдали и измеряли кровотечение, которое при необходимости останавливали вручную через 10-минут, чтобы предотвратить смерть. Измеряли объем потерянной крови на основе содержания гемоглобина.

#### Яванские макаки

Использовали для исследования 8 яванских макаков, не получавших ранее какого-либо лечения. Осуществили измерение агрегации тромбоцитов в основном, как это описано применительно к тромбоцитам человека, с использованием коллагена в концентрации  $2,5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Измерили количество тромбоцитов в крови, предохраненной от свертывания с помощью ЭДТА. Измерили длительность кровотечения у бодрствующих обезьян на поверхности предплечья согласно стандартной клинической процедуре с помощью 0,5-см устройства Surgicutt™ для измерения длительности кровотечения с использованием. Измерили экспрессию GPVI измерялась в основном, как описано выше, с использованием предлагаемого на рынке конъюгированного с FITC моноклонального антитела против GPVI человека (клон 1G5, Biocytex), который вступает в перекрестную реакцию с GPVI яванских макаков.

#### Результаты

Связывание *In vitro* антителом АСТ017 тромбоцитов человека

На фиг. 3 показана типичная кривая связывания конъюгированным с Alexa488 антителом АСТ017 тромбоцитов человека по результатам проточной цитометрии. Насыщение цельной крови и PRP тромбоцитами достигается при концентрации антитела

5 1-2 мкг/мл (20-40 нМ).

Ингибирование *in vitro* индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов человека

На фиг. 4 показаны типичные кривые агрегации, полученные после предварительной инкубации PRP человека с АСТ017 в возрастающих концентрациях. В этих условиях АСТ017 полностью ингибировал индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов

10 при концентрации  $\geq 5$  мкг/мл.

Определили количественно способность АСТ017 ингибировать индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов по скорости и интенсивности отклика, как показано на фиг. 5. Средняя величина  $IC_{50}$  интенсивности и скорости для трех различных доноров составляла  $3,2 \pm 2,5$  и  $2 \pm 0,7$  мкг·мл<sup>-1</sup>, соответственно, при этом общее ингибирование в

15

обоих случаях наблюдалось при концентрации  $6,7 \pm 2,9$  мкг·мл<sup>-1</sup> что хорошо согласуется с результатами связывания тромбоцитов.

Таким образом, эти результаты, демонстрируют, что белки согласно изобретению являются мощными ингибиторами индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов.

20

С целью анализа *ex vivo* воздействия АСТ017 на индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов, количество тромбоцитов и экспрессию GPVI внутривенно ввели гуманизированным GPVI мышам АСТ017 (1,2 или 4 мг/кг) или носитель. Через 30 минут после инъекции собрали кровь для анализа индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов, количества тромбоцитов и экспрессии GPVI.

25

Как показано на фиг. 6, полное ингибирование индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов наблюдается, когда мыши получали АСТ017 в дозе  $\geq 0,5$  мг/кг.

Что касается экспрессии GPVI, не выявлено статистического различия в средней флуоресценции тромбоцитов в образцах, полученных до и после лечения, а также между образцами, взятыми у мышей, получавших носитель (0 мг/кг АСТ017) или АСТ017 в

30

различных дозах (фиг. 7, левая панель). Средняя и правая панели на фиг. 7 иллюстрируют эволюцию экспрессии GPVI с момента до инъекции до момента через 30 минут после инъекции у отдельных животных, получавших носитель или 4 мг/кг АСТ017.

Эти результаты показывают, что АСТ017 не вызывает истощения GPVI *in vivo*.

35

Кроме того, измерили количество тромбоцитов у мышей, получавших носитель (0 мг/кг АСТ017) или АСТ017 (4 мг/кг). Как показано на фиг. 8, не выявлено статистического различия между двумя группами не была подтверждена (средняя величина  $\pm$  стандартное отклонение:  $847,7 \pm 110,5$  против  $842 \pm 115,5$ ).

Длительность кровотечения и потери крови, измеренные путем перерезания хвоста мышей через 30 мин после введения АСТ017 (4 мг/кг), не изменялись по сравнению с величинами у контрольных мышей (получавших инъекцию носителя) (фиг. 9). Для сравнения у мышей, получавших клопидогрель (10 мг/кг накануне и за два часа до эксперимента), значительно увеличилась длительность кровотечения, а также потеря

40

крови. Этот результат демонстрирует, что АСТ017 не вызывает снижение количества тромбоцитов, т.е. тромбоцитопению *in vivo*.

45

Дополнительно охарактеризовали эффект АСТ017 при введении приматам помимо человека. В исследовании участвовало восемь яванских макаков. Сначала в течение 15 мину внутривенно вводили возрастающие дозы АСТ017 (1, 2, 4, 8 мг/кг). Собрали кровь через 30 минут и 2 часа после введения. Агрегация тромбоцитов обратимо

ингибировалась в зависимости от доз (фиг. 10). Увеличение дозы с 1 до 2 и с 2 до 4 мг/кг усиливало эффект, а доза 8 мг/кг не имела дополнительного эффекта по сравнению с дозой 4 мг/кг. Количество тромбоцитов, измеренное через 24 часа после инъекции, не изменилось по сравнению с величинами, полученными перед инъекцией (фиг. 11).

5 После введения носителя или 2, 4 или 8 мг/кг АСТ017 (фиг. 12) не наблюдалось значительного увеличения длительности кровотечения. Затем, после вымывания яванские макаки получили АСТ017 (2 или 8 мг/кг) в форме одночасовой перфузии. Измерили агрегации тромбоцитов и экспрессию GPVI в различное время после начала лечения: (через 1, 1,5, 2, 4 и 7 часов) (фиг. 13 и 14). У макаков, получивших 8 мг/кг, обратимо  
10 ингибировалась индуцированная коллагеном агрегация тромбоцитов и возрастала длительность эффекта по сравнению с дозой 2 мг/кг (фиг. 13). Экспрессия GPVI в тромбоцитах оставалась стабильной в различное время после начала лечения по сравнению с показателями до лечения (фиг. 14).

Вместе эти результаты подтверждают, что введение АСТ017 приматам помимо  
15 человека эффективно и обратимо ингибирует функцию GPVI без воздействия на количество тромбоцитов, экспрессию GPVI на поверхности тромбоцитов или длительность кровотечения.

#### Пример 5. Картирование эпитопов

##### Материалы и методы

20 С целью реконструкции эпитопов молекул-мишеней, то есть GPVI человека, синтезировали библиотеку пептидов. Получили аминокислотизированную полипропиленовую подложку путем прививки фирменной гидрофильной полимерной композиции с последующей реакцией с трет-бутилоксикарбонил-гексаметилендиамином (BocHMDA) с использованием дициклогексилкарбодиимида (DCC) с N-  
25 гидроксibenзотриазолом (HOBt), а затем расщеплением Boc-групп с использованием трифторуксусной кислоты (TFA). Использовали стандартный синтез Fmoc-пептида для синтеза пептидов на аминокислотизированной твердой подложке с помощью  
30 заказных манипуляторов для жидкостей JANUS (Perkin Elmer).

Осуществили синтез структурных имитаций с использованием фирменной технологии  
30 Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) компании Pepscan. Технология CLIPS позволяет структурировать пептиды в одиночные петли, двойные петли, тройные петли, листовидные складки, спиральные складки и их комбинации. Конъюгировали шаблоны CLIPS с цистеиновыми остатками. Конъюгировали боковые цепи множества цистеинов в пептидах с одним или двумя шаблонами CLIPS. Например, растворили 0,5 мМ раствор  
35 P2 CLIPS (2,6-бис(бромметил)пиридин) в бикарбонате аммония (20 мМ, pH 7,8)/ацетонитриле (1:3 по объему). Добавили этот раствор на пептидные матрицы. Шаблон CLIPS связал боковые цепи двух цистеинов, присутствующих в твердофазных связанных пептидах пептидных матриц (455-луночный планшет с 3-мкл лунками). В течение 30-  
60 минут осторожно встряхивали пептидные матрицы, полностью покрытые раствором.  
40 Наконец, интенсивно промыли пептидные матрицы обильным количеством H<sub>2</sub>O и в течение 30 минут обрабатывали ультразвуком в буферном растворе, содержащем 1% SDS/0,1% бета-меркаптоэтанол в PBS (pH 7,2), при 70°C с последующей обработкой ультразвуком в H<sub>2</sub>O еще в течение 45 минут. Аналогичным образом изготовили T3  
45 CLIPS, содержащие пептиды, но с тремя цистеинами.

Испытали связывание антителом АСТ017 каждого из синтезированных пептидов методом ELISA на основе PEPSCAN. Инкубировали пептидные матрицы с раствором первичного антитела (в течение ночи при 4°C). После промывания в течение одного часа инкубировали пептидные матрицы с разбавленным в соотношении 1/1000

соответствующим конъюгатом пероксидазы и антитела (SBA, конъюгатом козьего антитела и HRP человека, Southern Biotech, 2010-05) при 25°C. После промывания добавили пероксидазного субстрата 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3-процентной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Через час измерили проявление цвета. Представили

5 проявление цвета в количественной форме с помощью камеры на приборах с зарядовой связью (ПЗС) и системы обработки изображений.

Величины, определенные с помощью ПЗС-камеры, варьировали от 0 до 3000 мА, что аналогично показаниям стандартного считывателя ELISA для 96-луночных планшетов. Представили результаты в количественной форме и сохранили в базе данных

10 Perlab.

С целью проверки качества синтезированных пептидов параллельно синтезировали отдельный набор положительных и отрицательных контрольных пептидов. Подвергли их скринингу антителом 57.9 (Posthumus и др., J. Virology, 1990, 64: 3304-3309).

Проанализировали профили интенсивности для каждого набора пептидов (линейные, спиральные, петлевые, прерывистые) и оценили систематическое связывание.

15

Результаты

После нескольких раундов оптимизации условий было показано, что АСТ017 систематически распознает прерывистый эпитоп, состоящий из фрагментов секвенирования пептидов GPAVSSGGDVTLQCQ и TVTAAHSGTYRCYSF, из которых

20 GPAVSSGGDVTLQCQ является доминирующей частью сайта распознавания, поскольку ограниченные CLIPS пептиды, содержащие эту последовательность, также могут быть связаны антителом АСТ017; однако отсутствует обнаруживаемое связывание с линейными пептидами, содержащими эту последовательность.

Вне связи с какой-либо теорией предполагается, что фрагмент секвенирования пептидов TVTAAHSGTYRCYSF, вероятно, обеспечивает дополнительный структурный

25 контекст связывания.

Фрагмент секвенирования пептидов GPAVSSGGDVTLQCQ в GPVI мыши значительно модифицирован несколькими несинонимическими мутациями; напротив, он является высококонсервативным у приматов помимо человека. Вне связи с какой-либо теорией

30 предполагается, что этим объясняется, почему АСТ017 связывает GPVI человека и GPVI приматов помимо человека, но не GPVI мыши.

Вне связи с какой-либо теорией предполагается, что связывание антителом АСТ017 идентифицированного эпитопа должно нарушать связывание коллагеном Ig-подобного домена 1 типа C2 (D1) GPVI и/или димеризацию GPVI и последующую высокую

35 аффинность коллагену.

Перечень последовательностей

<110> АКТИКОР ВИОТЕК [FR]

БИЛЬАЛЬДЕ, Филип; ЖАНРО-ПЕРРУС, Мартине

<120> Белок, связанный с гликопротеином человека

40 <140> PCT/EP2016/068778

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> SEQ ID NO:1

<211> 10

<212> PRT

45 <213> Искусственная последовательность

<223> VH-CDR1

<400>

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His

```

1             5             10
<210> SEQ ID NO:2
<211> 17
<212> PRT
5 <213> Искусственная последовательность
<223> VH-CDR2
<400>
Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1             5             10             15
10 Gly
<210> SEQ ID NO:3
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
15 <223> VH-CDR3
<400>
Gly Thr Val Val Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1             5             10
<210> SEQ ID NO:4
20 <211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<223> VL-CDR1
<400>
25 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1             5             10             15
<210> SEQ ID NO:5
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Искусственная последовательность
<223> VL-CDR2
<400>
Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1             5
35 <210> SEQ ID NO:6
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<223> VL-CDR3
40 <400>
Leu Gln Leu Thr His Val Pro Trp Thr
1             5
<210> SEQ ID NO:7
<211> 120
45 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<223> Вариабельная область тяжёлой цепи
<400>

```

RU 2773 819 C2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 5 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 10 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Thr Val Val Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> SEQ ID NO:8

<211> 113

<212> PRT

20 <213> Искусственная последовательность

<223> Вариабельная область лёгкой цепи

<400>

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 30 50 55 60  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu  
 85 90 95  
 35 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Thr  
 100 105 110

Arg

<210> SEQ ID NO:9

<211> 113

40 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<223> Вариабельная область лёгкой цепи

<400>

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 45 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

RU 2773 819 C2

	35		40		45														
	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro			
	50						55					60							
	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile			
5	65				70					75					80				
	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Leu			
				85				90					95						
	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105						110					
10	Arg																		
	<210>	<b>SEQ ID NO:10</b>																	
	<211>	360																	
	<212>	ДНК																	
	<213>	Искусственная последовательность																	
15	<223>	Вариабельная область тяжёлой цепи																	
	<400>																		
	caggttcagc	tggttcagtc	aggggctgag	gtgaagaagc	ctggagcctc	agtgaaggtg													60
	tcttgcaagg	cttctggcta	cacatttacc	agttacaata	tgactgggt	aagacaggct													120
	cctggacagg	gcctggaatg	gatgggaggt	atztatccag	gaaatgggtg	tacttctac													180
20	aatcagaagt	tccagggccg	agttactatg	actcgggaca	cttccacctc	tacagtgtac													240
	atggagctca	gcagcctgag	atctgaggac	accgcggtct	attactgtgc	aagaggcacc													300
	gtggtcggcg	actggtactt	cgatgtgtgg	ggccaaggca	ccctggtcac	cgtagagcagt													360
	<210>	<b>SEQ ID NO:11</b>																	
	<211>	339																	
25	<212>	ДНК																	
	<213>	Искусственная последовательность																	
	<223>	Вариабельная область тяжёлой цепи																	
	<400>																		
	gacatccaga	tgaccsagag	сссаагсagc	ctgagcgcca	gcgtgggtga	cagagtgacc													60
30	atcacctgta	gaagtagtca	gagccttgag	aacagcaacg	gaaacaccta	cctgaattgg													120
	taccagcaga	agccaggtaa	ggctccaaaag	ctgctgatct	acagagtffc	caaccgattc													180
	tctggtgtgc	саагсagatt	сagcggtagc	ggtagcggta	сcgacttcac	cttcaccatc													240
	agcagcctcc	agccagagga	catcgccacc	tactactgcc	tccagctgac	tcatgtccca													300
	tggaccttcg	gtcagggcac	сааггtggag	atcacccgg															339
35	<210>	<b>SEQ ID NO:12</b>																	
	<211>	339																	
	<212>	ДНК																	
	<213>	Искусственная последовательность																	
	<223>	Вариабельная область лёгкой цепи																	
40	<400>																		
	gacatccaga	tgaccsagag	сссаагсagc	ctgagcgcca	gcgtgggtga	cagagtgacc													60
	atcacctgta	gtgccagtca	gagccttgag	aacagcaacg	gaaacaccta	cctgaattgg													120
	taccagcaga	agccaggtaa	ggctccaaaag	ctgctgatct	acagagtffc	caaccgattc													180
	tctggtgtgc	саагсagatt	сagcggtagc	ggtagcggta	сcgacttcac	cctcaccatc													240
45	agcagcctcc	agccagagga	cttcgcccacc	tactactgcc	tccagctgac	tcatgtccca													300
	tggaccttcg	gtcagggcac	сааггtggag	atcaaacgc															339
	<210>	<b>SEQ ID NO:13</b>																	
	<211>	339																	

RU 2773 819 C2

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly  
5 1 5 10 15  
Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala  
20 25 30  
Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys  
35 40 45  
10 Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser  
50 55 60  
Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg  
65 70 75 80  
Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp  
15 85 90 95  
Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala  
100 105 110  
Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly  
115 120 125  
20 Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala  
130 135 140  
Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp  
145 150 155 160  
Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly  
25 165 170 175  
Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser  
180 185 190  
Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr  
195 200 205  
30 Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser  
210 215 220  
Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr  
225 230 235 240  
Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser  
35 245 250 255  
Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg  
260 265 270  
Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala  
275 280 285  
40 Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala  
290 295 300  
Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys  
305 310 315 320  
Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly  
45 325 330 335  
Leu Cys Ser

<210> SEQ ID NO:14

<211> 321

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <223> Константная область тяжёлой цепи  
 <400>

5 gcctccacca agggtcacct agtcttccca ctggcaccct cctccaagag cacctctggt 60  
 ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc cagaaccagt gactgtgtca 120  
 tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc ctgctgtctt gcagtcctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agtcgagcct 300  
 10 aagtcatgcg acaagactca c 321

<210> **SEQ ID NO:15**  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

15 <223> Константная область лёгкой цепи  
 <400>

actgtggctg caccaagtgt gttcatcttc ccacctagcg atgagcagtt gaaatctgga 60  
 actgcctctg tcgtgtgcct cctgaacaac ttctaccac gggaggcca ggtacagtgg 120  
 aagggtggata acgccctcca atccggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaagatagc 180  
 20 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgactctga gcaaagcaga ctacgagaag 240  
 cacaaggctt acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gttcccctgt cacaaagagc 300  
 ttcaaccggg gagagtgt 318

<210> **SEQ ID NO:16**  
 <211> 66

25 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<223> Сигнальный пептид  
 <400>

atggatatgc gtgtaccagc tcaactactt ggacttctat tgctttggct tcgtgggtgct 60  
 30 agatgt 66

<210> **SEQ ID NO:17**  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

35 <223> Сигнальный пептид  
 <400>

atggactgga cttggagaat cctattcttg gttgctgcag ctacaggtgc tcattca 57

<210> **SEQ ID NO:18**  
 <211> 762

40 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<223> Тяжёлая цепь  
 <400>

gcggccgcca ccatggactg gacttgagaga atcctattct tggttgctgc agctacaggt 60  
 45 gctcattcac aggttcagct gggttcagca ggggctgagg tgaagaagcc tggagcctca 120  
 gtgaagggtg cctgcaaggc ttctggctac acattacca gttacaatat gcactgggta 180  
 agacaggctc ctggacaggg cctggaatgg atgggaggta tttatccagg aatgggtgat 240  
 acttcctaca atcagaagtt ccagggccga gtactatga ctcgggacac ttccacctct 300

acagtgtaca tggagctcag cagcctgaga tctgaggaca ccgcggtcta ttactgtgca 360  
 agaggcaccg tggtcggcga ctggtacttc gatgtgtggg gccaggcac cctggtcacc 420  
 gtgagcagtg cctccaccaa gggtcctca gtcttcccac tggcaccctc ctccaagagc 480  
 acctctgggtg gcacagctgc cctgggctgc ctggccaagg actacttccc agaaccagtg 540  
 5 actgtgtcat ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc tgctgtcttg 600  
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 660  
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720  
 gtcgagccta agtcatgcga caagactcac tgatgaggat cc 762

<210> SEQ ID NO:19

10 <211> 742

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<223> Лёгкая цепь

<400>

15 gacgtcacca tggatatgcg tgtaccagct caactacttg gacttctatt gctttggctt 60  
 cgtggtgcta gatgtgacat ccagatgacc cagagcccaa gcagcctgag cgccagcgtg 120  
 ggtgacagag tgaccatcac ctgtagaagt agtcagagcc ttgagaacag caacggaaac 180  
 acctacctga attggtacca gcagaagcca ggtaaggctc caaagctgct gatctacaga 240  
 gtttccaacc gattctctgg tgtgccaagc agattcagcg gttagcgtag cggtagccgac 300  
 20 ttcaccttca ccatcagcag cctccagcca gaggacatcg ccacctacta ctgcctccag 360  
 ctgactcatg tcccatggac cttcggctcag ggcaccaagg tggagatcac ccgactgtg 420  
 gctgcaccaa gtgtgttcat cttcccacct agcgatgagc agttgaaatc tggaactgcc 480  
 tctgtcgtgt gcctcctgaa caacttctac ccacgggagg ccaaggtaca gtggaaggtg 540  
 gataacgccc tccaatccgg taactcccag gagagtgtca cagagcaaga tagcaaggac 600  
 25 agcacctaca gcctcagcag caccctgact ctgagcaaag cagactacga gaagcacaag 660  
 gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagttccc ctgtcacaaa gagcttcaac 720  
 cggggagagt gttgatgata tc 742

<210> SEQ ID NO:20

30 <211> 742

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<223> Лёгкая цепь

<400>

35 gacgtcacca tggatatgcg tgtaccagct caactacttg gacttctatt gctttggctt 60  
 cgtggtgcta gatgtgacat ccagatgacc cagagcccaa gcagcctgag cgccagcgtg 120  
 ggtgacagag tgaccatcac ctgtagtgcc agtcagagcc ttgagaacag caacggaaac 180  
 acctacctga attggtacca gcagaagcca ggtaaggctc caaagctgct gatctacaga 240  
 gtttccaacc gattctctgg tgtgccaagc agattcagcg gttagcgtag cggtagccgac 300  
 ttcaccttca ccatcagcag cctccagcca gaggacttctg ccacctacta ctgcctccag 360  
 40 ctgactcatg tcccatggac cttcggctcag ggcaccaagg tggagatcaa acgactgtg 420  
 gctgcaccaa gtgtgttcat cttcccacct agcgatgagc agttgaaatc tggaactgcc 480  
 tctgtcgtgt gcctcctgaa caacttctac ccacgggagg ccaaggtaca gtggaaggtg 540  
 gataacgccc tccaatccgg taactcccag gagagtgtca cagagcaaga tagcaaggac 600  
 agcacctaca gcctcagcag caccctgact ctgagcaaag cagactacga gaagcacaag 660  
 45 gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagttccc ctgtcacaaa gagcttcaac 720  
 cggggagagt gttgatgata tc 742

<210> SEQ ID NO:21

<211> 4

<212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <223> CDR-L3 - остатки после  
 <221> сайт  
 5 <222> 3  
 <223> X - любая аминокислота  
 <400>  
 Phe Gly Xaa Gly  
 1  
 10 <210> **SEQ ID NO:22**  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <223> CDR-H1 - остатки после  
 15 <221> сайт  
 <222> 2  
 <223> X -любая аминокислота  
 <221> сайт  
 <222> 3  
 20 <223> X- любая аминокислота  
 <221> сайт  
 <222> 4  
 <223> X -любая аминокислота  
 <400>  
 25 Cys Xaa Xaa Xaa  
 1  
 <210> **SEQ ID NO:23**  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <223> CDR-H2 - остатки до  
 <400>  
 Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5  
 35 <210> **SEQ ID NO:24**  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <223> CDR-H3 - остатки после  
 40 <221> сайт  
 <222> 3  
 <223> X-любая аминокислота  
 <400>  
 Trp Gly Xaa Gly  
 45 1

## (57) Формула изобретения

1. Выделенный гуманизированный белок, специфически связывающий гликопротеин

VI человека (hGPVI) и являющийся моновалентным антиген-связывающим фрагментом антитела, причем вариабельная область тяжелой цепи указанного фрагмента содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельная область легкой цепи указанного фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

2. Выделенный гуманизированный белок, специфически связывающий гликопротеин VI человека (hGPVI) по п. 1, при этом упомянутый белок имеет Kd связывания hGPVI менее 15 нМ, измеренную поверхностным плазмонным резонансом с использованием 960-1071 RU растворимого GPVI человека и с использованием PBS с pH 7.4 в качестве подвижного буфера, и выделенный гуманизированный белок не индуцирует фенотип истощения GPVI *in vivo*.

3. Выделенный гуманизированный белок, специфически связывающий гликопротеин VI человека (hGPVI) по п. 1, представляющий антиген-связывающий фрагмент, выбранный из группы, включающей Fv или Fab.

4. Применение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество выделенного гуманизованного белка, специфически связывающего гликопротеин VI человека (hGPVI), по любому из пп. 1-3 для лечения сердечнососудистого заболевания или события, связанного с тромбозом.

5. Применение фармацевтической композиции для лечения сердечно-сосудистого заболевания или события, связанного с тромбозом, содержащей выделенный гуманизированный белок, специфически связывающий гликопротеин VI человека (hGPVI), по любому из пп. 1-3 в терапевтически эффективном количестве и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый эксципиент.

6. Применение фармацевтической композиции по п. 5, где сердечно-сосудистую болезнь или событие, связанное с тромбозом, выбирают из артериального и венозного тромбоза, рестеноза, острого коронарного синдрома, ишемических нарушений мозгового кровообращения, заболеваний сосудов головного мозга, венозной тромбоэмболии и сосудистой пурпуры.

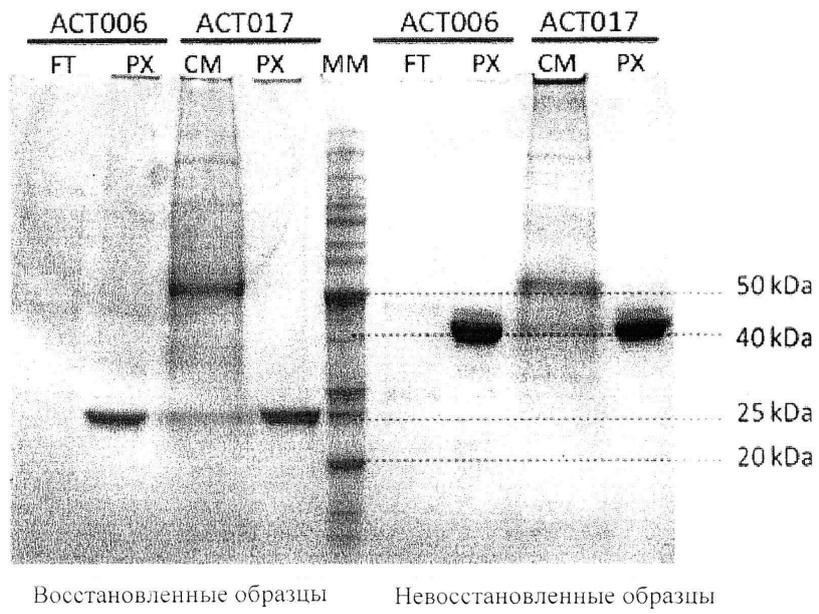
7. Применение фармацевтической композиции по п. 5, где сердечно-сосудистое заболевание или событие, связанное с тромбозом, выбирают из заболеваний коронарных артерий и церебрального атеросклероза.

8. Применение фармацевтической композиции по п. 5, где сердечно-сосудистое заболевание или событие, связанное с тромбозом, выбирают из группы, включающей атеротромбоз, ишемические события, острый коронарный синдром, инфаркт миокарда, инсульт, чрескожное коронарное вмешательство, тромбоз стента, ишемический рестеноз, острую ишемию, хроническую ишемию, заболевания аорты и ее ветвей, болезнь периферических артерий, венозный тромбоз, острый флебит и легочную эмболию, связанный с раком тромбоз, воспалительный тромбоз и тромбоз, связанный с инфекцией.

9. Вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую выделенный гуманизированный белок, специфически связывающий гликопротеин VI человека (hGPVI) по любому одному из пп. 1-3, где указанный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, или любую последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную SEQ ID NO: 10, и нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, или любую последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную SEQ ID NO: 11-12 .

1

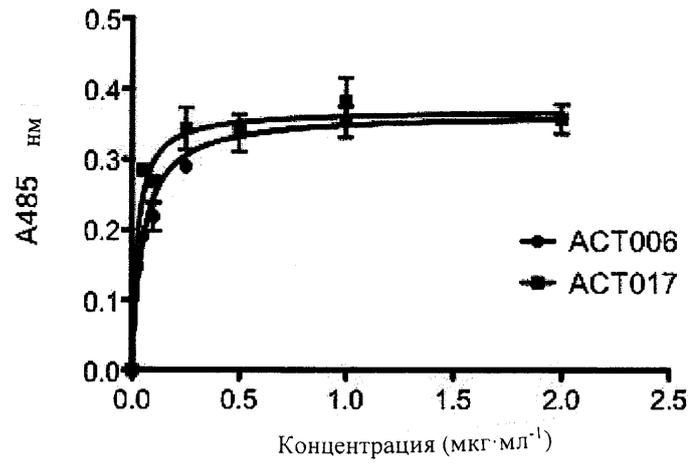
1/13



Фиг. 1

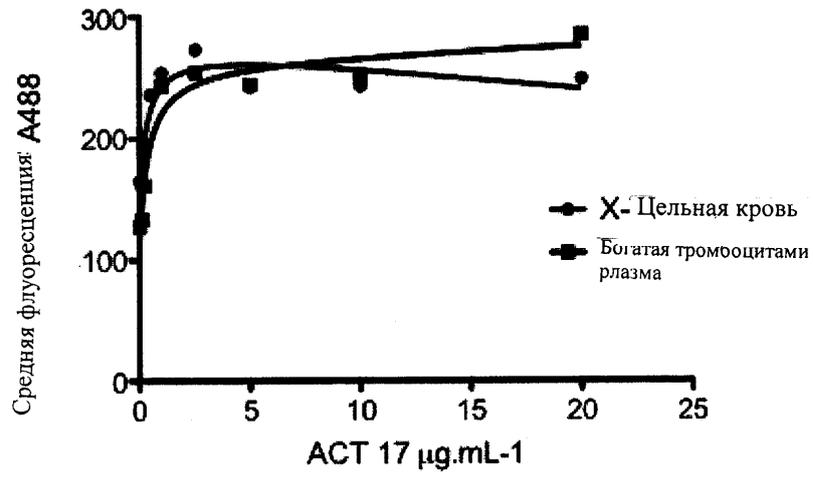
2

2/13



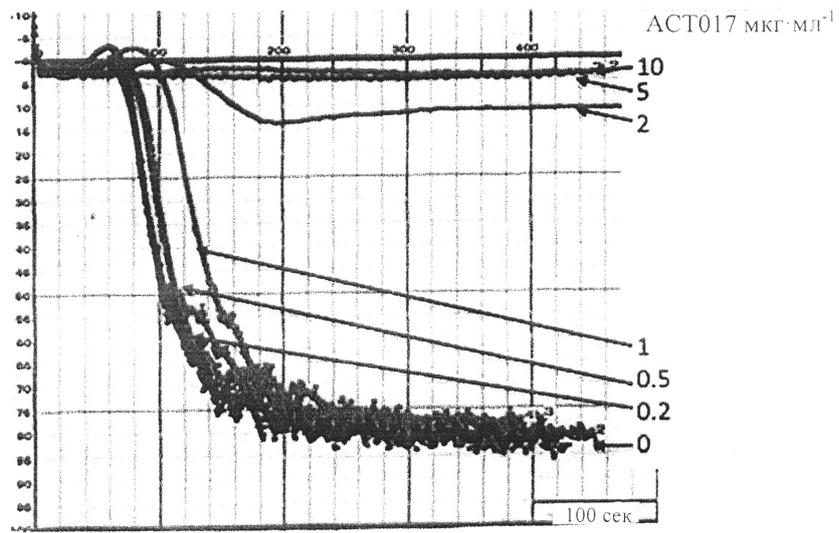
Фиг. 2

3/13



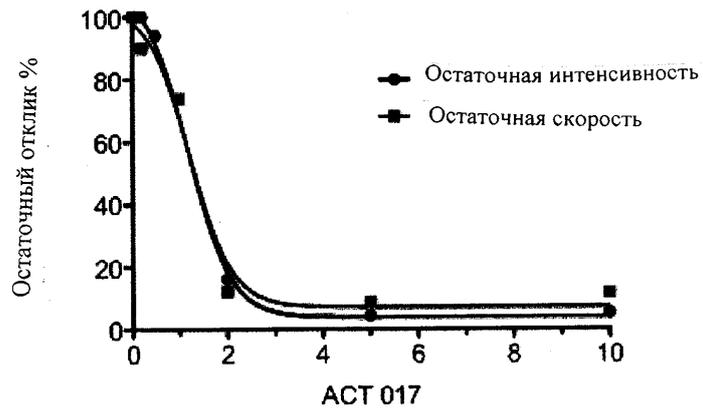
**DC50 Sang** 0.38 мкг·мл<sup>-1</sup> (7 · 10<sup>-9</sup> M)  
 Богатая тромбоцитами плазма 0.43 мкг·мл<sup>-1</sup> (8 · 10<sup>-9</sup> M)

Фиг. 3



Фиг.4

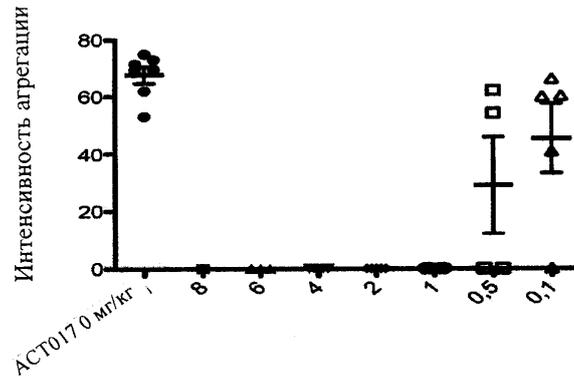
5/13



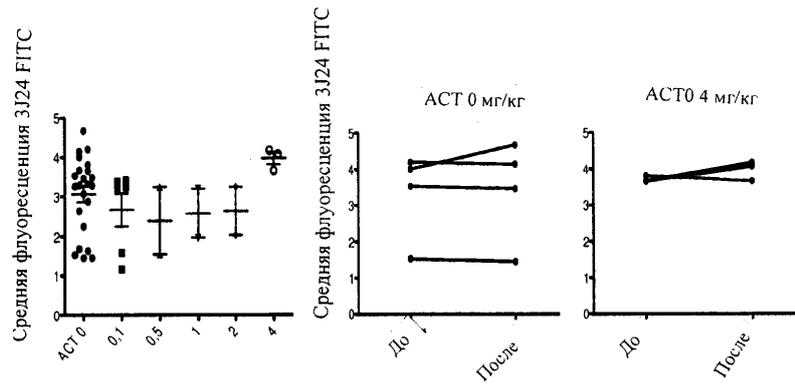
IC50 интенсивности и скорости:  $1,2 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} (25 \cdot 10^{-9})$

Фиг. 5

6/13

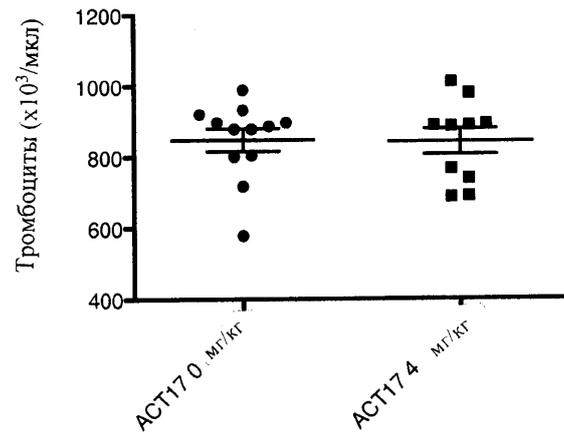


Фиг. 6



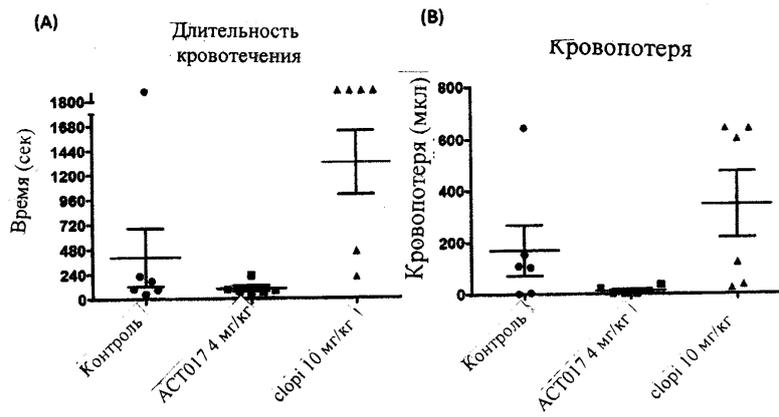
Фиг. 7

7/13



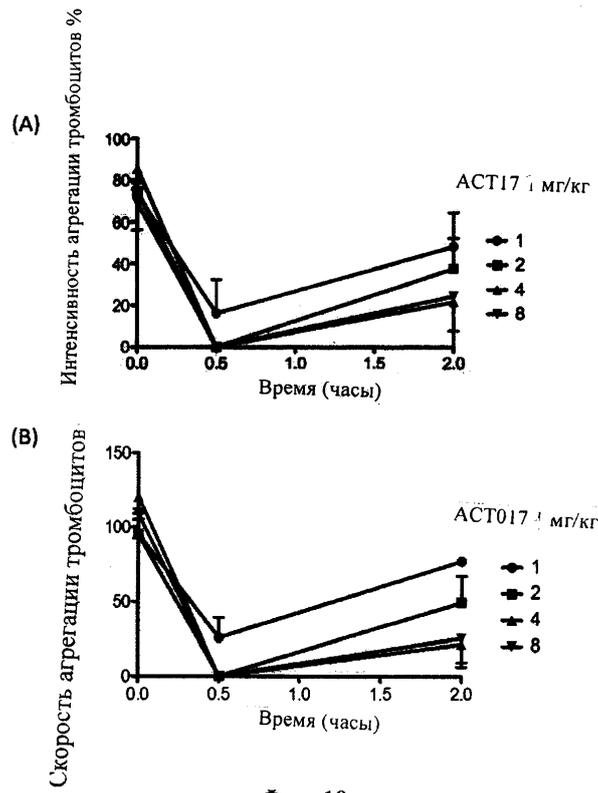
Фиг. 8

8/13



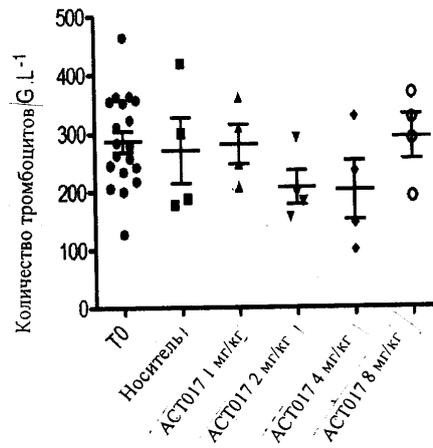
Фиг. 9

9/13



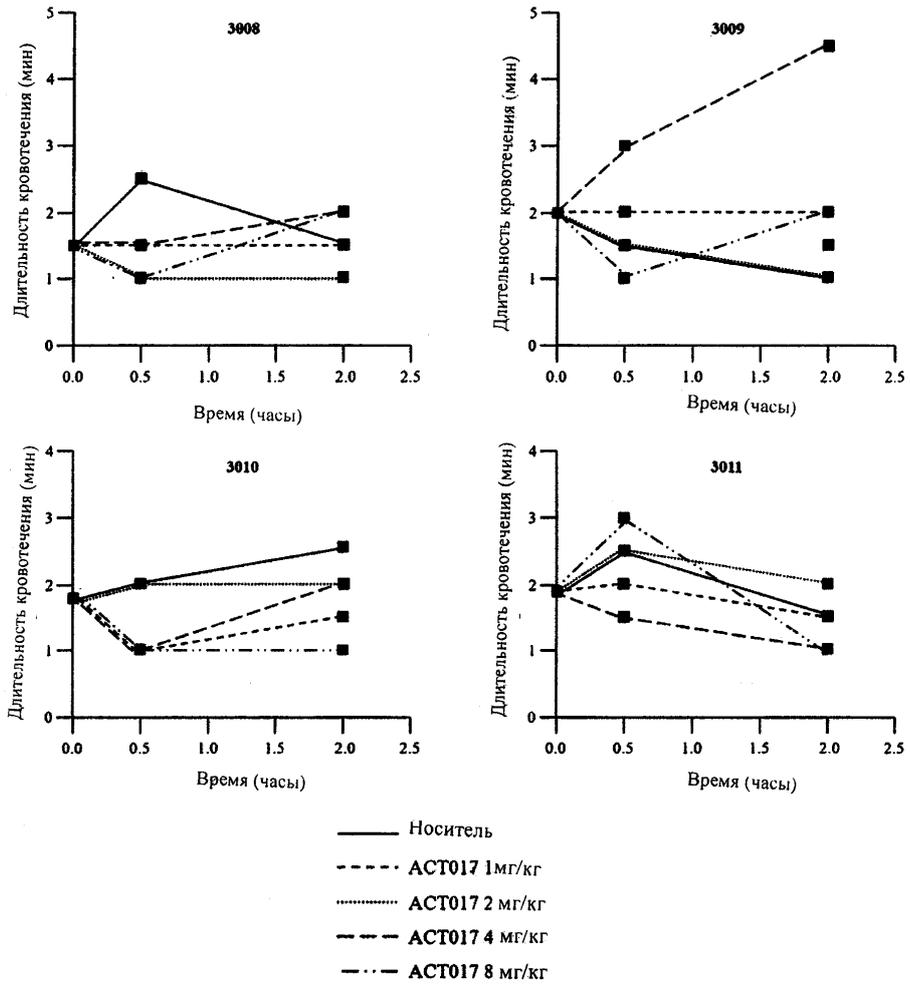
Фиг. 10

10/13



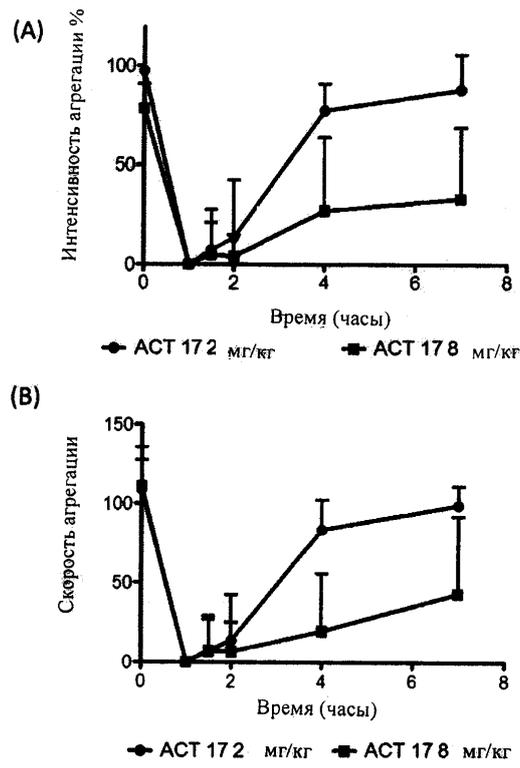
Фиг. 11

11/13



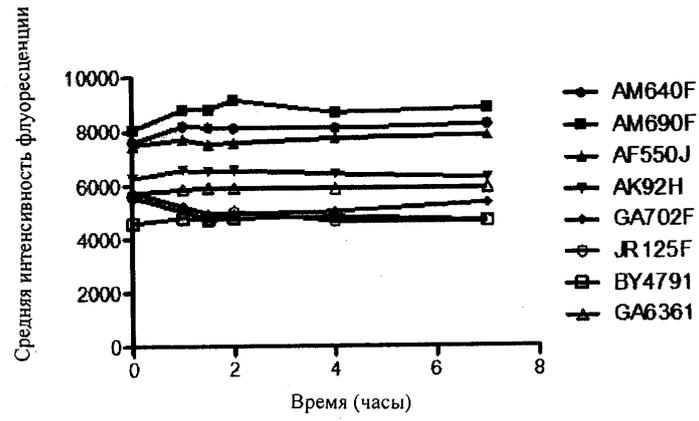
Фиг. 12

12/13



Фиг. 13

13/13



Фиг. 14