



(19) **UA** (11) **76 936** (13) **C2**
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2001075213, 23.12.1999

(24) Дата начала действия патента: 16.10.2006

(30) Приоритет: 23.12.1998 US 60/113,647

(46) Дата публикации: 15.10.2006A01H 5/00
20060101ALI20051220RMUA A01K
67/027 20060101ALI20051220RMUA
A61K 39/395
20060101ALI20051220RMUA A61P
29/00 20060101ALI20051220RMUA
A61P 35/00
20060101ALI20051220RMUA A61P
37/02 20060101ALI20051220RMUA
A61P 37/04
20060101ALI20051220RMUA C07K
16/28 20060101ALI20051008RMUA
C12N 1/15
20060101ALI20051220RMUA C12N
1/19 20060101ALI20051220RMUA
C12N 1/21
20060101ALI20051220RMUA C12N
5/10 20060101ALI20051220RMUA
C12N 15/02
20060101ALI20051220RMUA C12N
15/09 20060101ALI20051220RMUA
C12P 21/08
20060101ALI20051220RMUA C12Q
1/02 20060101ALI20051220RMUA
G01N 33/15
20060101ALI20051220RMUA G01N
33/50 20060101ALI20051220RMUA
G01N 33/577
20060101ALI20051220RMUA

(86) Заявка PCT:
PCT/US99/30895, 19991223

(72) Изобретатель:

Хансон Дуглас Чарльз, US,
Невью Марк Джозеф, US,
Мюллер Эйлин Эллиот, US,
Ханк Джеффри Герберт, US,
Гилман Стивен Кристофер, US,
Дэвис К. Джеффри, US,
Корвалан Хосе Рамон, US

(73) Патентовладелец:

ПФАЙЗЕР ИНК., US,
АБДЖЕНИКС, ИНК., US

(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ЧЕЛОВЕКА, КОТОРОЕ СВЯЗЫВАЕТ АНТИГЕН-4
ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО Т-ЛИМФОЦИТА (CTLA-4), НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, ЛИНИЯ КЛЕТОК, СПОСОБ
ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННОГО МЛЕКОПИТАЮЩЕГО, СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ IL-2 ИЛИ
IFN- γ В Т-КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТА, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, КОТОРАЯ
ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАКА, ВОСПАЛЕНИЯ ИЛИ АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ,
ВКЛЮЧАЮЩАЯ ДАННОЕ АНТИТЕЛО

(57) Реферат:

Изобретение относится к человеческим
моноклональным антителам против антигена 4
цитотоксического Т-лимфоцита человека (CTLA-4).
Предлагаются последовательности нуклеотидов,

кодирующих аминокислотные
последовательности, включающие молекулы
тяжелых и легких цепей таких иммуноглобулинов.
Изобретение также относится к линии клеток,
продуцирующей данные антитела, способу

получения трансгенного млекопитающего, способу увеличения продуцирования IL-2 или IFN- γ в Т-клетках пациента, способу увеличения цитотоксического ответа Т-клеток пациента, способу лечения опухолей у пациента и фармацевтической композиции, которая используется при лечении рака, воспаления или аутоиммунного заболевания, включающей данное

антитело.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 10, 15.10.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2



(19) **UA** (11) **76 936** (13) **C2**
(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE
STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2001075213, 23.12.1999

(24) Effective date for property rights: 16.10.2006

(30) Priority: 23.12.1998 US 60/113,647

(46) Publication date: 15.10.2006A01H 5/00
20060101AFI20051220RMUA A01K
67/027 20060101ALI20051220RMUA
A61K 39/395
20060101ALI20051220RMUA A61P
29/00 20060101ALI20051220RMUA
A61P 35/00
20060101ALI20051220RMUA A61P
37/02 20060101ALI20051220RMUA
A61P 37/04
20060101ALI20051220RMUA C07K
16/28 20060101ALI20051008RMUA
C12N 1/15
20060101ALI20051220RMUA C12N
1/19 20060101ALI20051220RMUA
C12N 1/21
20060101ALI20051220RMUA C12N
5/10 20060101ALI20051220RMUA
C12N 15/02
20060101ALI20051220RMUA C12N
15/09 20060101ALI20051220RMUA
C12P 21/08
20060101ALI20051220RMUA C12Q
1/02 20060101ALI20051220RMUA
G01N 33/15
20060101ALI20051220RMUA G01N
33/50 20060101ALI20051220RMUA
G01N 33/577
20060101ALI20051220RMUA

(86) PCT application:
PCT/US99/30895, 19991223

(72) Inventor:

Hanson Douglas Charles, US,
Neveu Mark Joseph, US,
Mueller Eileen Elliot, US,
Hanke Jeffrey Herbert, US,
Gilman Stephen Christopher, US,
Davis C. Geoffrey, US,
Corvalan Jose Ramon, US

(73) Proprietor:

PFIZER INC., US,
ABGENIX, INC., US

(54) HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY BINDING THE ANTIGEN-4 OF CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE (CTLA-4), NUCLEIC ACID, CELL LINE, METHOD OF OBTAINING TRANSGENIC MAMMAL, METHOD TO INCREASE PRODUCING IL-2 OR IFN- γ IN THE T-CELLS OF A PATIENT, METHOD TO TREAT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION USED IN TREATMENT OF CANCER, INFLAMMATION OR AUTOIMMUNE DISEASE, INCLUDING THE ANTIBODY

(57) Abstract:

The present invention relates to methods and products for immunotherapy resulting in the stimulation of T-cell proliferation. The products of the invention are peptides that bind to CTLA-4 and co-stimulate the proliferation of T-cells by

inhibiting the binding of B7 to CTLA-4. Pharmaceutical compositions including such peptides are also provided. The invention further provides in vitro and in vivo therapeutic methods employing the peptides of the invention.

Official bulletin "Industrial property". Book
1 "Inventions, utility models, topographies of
integrated circuits", 2006, N 10, 15.10.2006.

State Department of Intellectual Property of the
Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2



(19) **UA** (11) **76 936** (13) **C2**
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2001075213, 23.12.1999

(24) Дата набуття чинності: 16.10.2006

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 23.12.1998 US 60/113,647

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.10.2006A01H 5/00
20060101ALI20051220RMUA A01K
67/027 20060101ALI20051220RMUA
A61K 39/395
20060101ALI20051220RMUA A61P
29/00 20060101ALI20051220RMUA
A61P 35/00
20060101ALI20051220RMUA A61P
37/02 20060101ALI20051220RMUA
A61P 37/04
20060101ALI20051220RMUA C07K
16/28 20060101ALI20051008RMUA
C12N 1/15
20060101ALI20051220RMUA C12N
1/19 20060101ALI20051220RMUA
C12N 1/21
20060101ALI20051220RMUA C12N
5/10 20060101ALI20051220RMUA
C12N 15/02
20060101ALI20051220RMUA C12N
15/09 20060101ALI20051220RMUA
C12P 21/08
20060101ALI20051220RMUA C12Q
1/02 20060101ALI20051220RMUA
G01N 33/15
20060101ALI20051220RMUA G01N
33/50 20060101ALI20051220RMUA
G01N 33/577
20060101ALI20051220RMUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору PCT:
PCT/US99/30895, 19991223

(72) Винахідник(и):

Хансон Дуглас Чарльз , US,
Нев'ю Марк Джозеф , US,
Мюллер Ейлін Елліот , US,
Ханк Джеффрі Герберт , US,
Гілман Стівен Крістофер , US,
Девіс К. Джеффрі , US,
Корвалан Хосе Рамон , US

(73) Власник(и):

ПФАЙЗЕР ІНК., US,
АБДЖЕНІКС, ІНК., US

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО ЛЮДИНИ, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄ АНТИГЕН-4 ЦИТОТОКСИЧНОГО Т-ЛІМФОЦИТУ (СТЛА-4), НУКЛЕІНОВА КИСЛОТА, ЛІНІЯ КЛІТИН, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ТРАНСГЕННОГО ССАВЦЯ, СПОСІБ ЗБІЛЬШЕННЯ ПРОДУКУВАННЯ ІЛ-2 АБО ІFN- γ У Т-КЛІТИНАХ ПАЦІЄНТА, СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ ПРИ ЛІКУВАННІ РАКУ, ЗАПАЛЕННЯ АБО АУТОІМУННОГО ЗАХВОРЮВАННЯ, ЩО ВКЛЮЧАЄ ДАНЕ АНТИТІЛО

(57) Реферат:

Винахід належить до людських моноклональних антитіл проти антигена 4 цитотоксичного

Т-лімфоцита людини (СТЛА-4). Пропонуються послідовності нуклеотидів, що кодують амінокислотні послідовності, що включають

молекули важких і легких ланцюгів таких імуноглобулінів. Винахід також належить до лінії клітин, що продукує дані антитіла, способу одержання трансгенного ссавця, способу збільшення продукування IL-2 або IFN-Г у Т-клітинах пацієнта, способу збільшення

цитотоксичної відповіді Т-клітин пацієнта, способу лікування пухлин у пацієнта та фармацевтичної композиції, яка використовується при лікуванні раку, запалення або аутоімунного захворювання, що включає дане антитіло.

UA 7 6 9 3 6 C 2

UA 7 6 9 3 6 C 2

Опис винаходу

У даній заявці декларується пріоритет попередньої [патентної заявки США, серійний №60/113647, зареєстрованої 23 грудня 1998р.], розкриття якої повністю включене тут як посилання.

Відповідно до даного винаходу тут пропонуються цілком людські моноклональні антитіла проти антигена 4 цитотоксичних Т-лимфоцитів людини (CTLA-4). Пропонуються послідовності нуклеотидів, що кодують амінокислотні послідовності, що включають молекули важких і легких ланцюгів імуноглобулінів, зокрема, прилеглі послідовності важких і легких ланцюгів, охоплюючі райони, що визначають комплементарність (CDRs), особливо від FR1 і/або CDR1 до CDR3 і/або в межах FR4. Додатково пропонуються антитіла, що мають схожі зв'язуючі властивості, і антитіла (або інші антагоністи), що мають функціональні властивості, схожі з розкритими тут антитілами.

Регуляція імунної відповіді у хворих повинна забезпечити бажане лікування багатьох захворювань людини, що може вести до специфічності дії, яка рідко зустрічається при застосуванні традиційних ліків. Повинна бути можливою як позитивна, так і негативна регуляція імунної відповіді. У зв'язку з регуляцією імунної відповіді інтенсивно вивчається і характеризується роль Т-клітин і В-клітин. Внаслідок цих досліджень виявилось, що в багатьох випадках роль Т-клітин особливо важлива для профілактики і лікування захворювань.

Т-клітини володіють дуже складними системами контролю взаємодії між ними. Для процесу взаємодії між Т-клітинами використовується множина рецепторів і розчинних факторів. Таким чином, ефект, який може надавати будь-який конкретний сигнал на імунну відповідь, залежить від конкретних факторів, рецепторів і зворотних рецепторів, які залучені до даного шляху. Шляхи негативної регуляції відповідей також важливі, як і шляхи, необхідні для активації. Навчання тимусу, яке веде до Т-клітинної толерантності, являє собою один з механізмів запобігання імунній відповіді на конкретний антиген. Відомі також інші механізми, такі як секреція цитокінів, що придушують імунну відповідь.

Активация Т-клітин вимагає не тільки стимуляції через рецептор антигена (Т-клітинний рецептор (TCR)), але і додаткового сигналу через коstimуляторні молекули поверхні клітини, такі як CD28. Лігандами для CD28 є білки B7-1 (CD80) і B7-2 (CD86), які експресуються на антиген-представляючих клітинах, таких як дендритні клітини, активовані В-клітини або моноцити, які взаємодіють з CD28 або CTLA-4 Т-клітин для надання коstimуляторного сигналу. Роль коstimуляторної сигналізації досліджена при експериментальному алергічному енцефаломієліті (EAE) [Perrin et al., *Immunol Res* 14: 189-99 (1995)]. EAE являє собою аутоімунне порушення, індуковане Th1-клітинами, направленими проти антигенів мієліну, що є моделлю для вивчення *in vivo* ролі коstimуляції, опосередкованої B7, в індукції патологічної імунної відповіді. За допомогою розчинного гібридного білкового ліганду рецепторів B7, а також моноклональних антитіл, специфічних у відношенні або CD80, або CD86, Perrin et al. показали, що коstimуляція B7 грає важливу роль у визначенні клінічного виходу захворювання при EAE.

Взаємодія між B7 і CD28 є одним з декількох коstimуляторних шляхів проведення сигналу, який, мабуть, істотний для ініціювання дозрівання і проліферації специфічних у відношенні антигена Т-клітин. Відсутність коstimуляції при одночасній неадекватній продукції ІЛ-2 запобігає подальшій проліферації Т-клітин і спричиняє стан відсутності реакції, який називається "анергією". Множина вірусів і пухлин можуть гальмувати активацію і проліферацію Т-клітин, що веде до недостатньої активності або відсутності реакції імунної системи господаря по відношенню до інфікованих або трансформованих клітин. Серед ряду можливих порушень Т-клітин анергія може, щонайменше, частково відповідати за нездатність організму господаря видаляти патогенні або пухлинні клітини. Застосування білка B7 для опосередкування протипухлинної імунної відповіді було [описане в Chen et al., *Cell* 71:1093-1102 (1992) і Townsend and Allison, *Science* 259:368 (1993)]. В огляді [Schwartz *Cell* 71: 1065 (1992)] розглядається роль CD28, CTLA-4 і B7 в утворенні ІЛ-2 і імунотерапії. [Harding et al. *Nature* 356:607-609 (1994)] демонструють, що опосередкована CD28 передача сигналу коstimулює Т-клітини миші і запобігає індукції анергії в клонах Т-клітин. Дивися також [патенти США №№5434131, 5770197 і 5773-253], а також [заявки на міжнародні патенти №№WO 93/00431, WO 95/01994/ WO 95/03408, WO 95/24217 і WO 95/33770].

З вказаного вище ясно, що для активації і подальшої диференціації до ефекторної функції Т-клітинам потрібно два типи сигналів від антиген-представляючої клітини (APC). По-перше, при взаємодіях між TCR Т-клітин і молекулами MHC, що представляють пептиди на APC, виникає специфічний у відношенні антигена сигнал. По-друге, є незалежний від антигенного сигнал, який виникає при взаємодії CD28 з членами сімейства B7 (B7-1 (CD80) або B7-2 (CD86)). Спочатку було неясно, на якому точно етапі імунної відповіді втручається CTLA-4. Мишачий CTLA-4 був уперше ідентифікований і клонований [Bruneir et al., *Nature* 328: 267-270 (1987)] як один з результатів пошуку молекул, які переважно експресуються на цитотоксичних Т-лімфоцитах. Незабаром після цього був ідентифікований і клонований CTLA-4 людини [Dariavach et al., *Eur. J. Immunol.* 18: 1901-1905 (1988)]. Молекули CTLA-4 миші і людини мають приблизно 76% спільної гомології послідовності і наближаються до повної ідентичності послідовності в своїх цитоплазматичних доменах [Dariavach et al. *Eur. J. Immunol.* 18: 1901-1905 (1988)]. CTLA-4 є членом імуноглобулінового (Ig) суперсімейства білків. Суперсімейство Ig являє собою групу білків, які виявляють ключові структурні особливості або варіабельного (V), або константного (C) домену молекул Ig. Члени суперсімейства Ig включають, але не обмежуються цим, власне імуноглобуліни, молекули класу головного комплексу гістосумісності (MHC) (тобто MHC класу I і II) і молекули TCR.

[У 1991 році Linsley et al., *J. Exp. Med.* 174: 561-569 (1991)] передбачили, що CTLA-4 є другим рецептором для B7. Схожим образом [Harper et al., *J. Immunol.* 147: 1037-44 (1991)] показали, що молекули CTLA-4 і CD28 є

близько родинними у миші і людини по послідовності, по експресії месенджера, по структурі гена і по хромосомній локалізації. [Дивися також Balzano et al., Int. J. Cancer. Suppl. 7: 28-32 (1992)]. Подальший доказ цієї ролі отриманий завдяки функціональним дослідженням. [Наприклад, Lenschow et al., Science 257: 789-792 (1992)] показали, що CTLA-4-Ig спричиняє довготривале виживання трансплантатів острівців підшлункової залози. [Freeman et al., Science 262: 907-909 (1993)] досліджували роль CTLA-4 у мишей з дефіцитом B7. Визначення лігандів CTLA-4 [описане Lenschow et al., P.N.A.S. 90: 11054-11058 (1993)]. [Linsley et al., Science 257: 792-795 (1992)] описують імуносупресію in vivo розчинною формою CTLA-4. [Linsley et al., J. Exp. Med. 176: 1595-604 (1992)] отримали антитіла, які зв'язували CTLA-4 і які не реагували перехресно з CD28, і дійшли висновку, що CTLA-4 коекспресується з CD28 на активованих Т-лімфоцитах і кооперативно регулює адгезію Т-клітин і активацію під дією B7. [Kuchroo et al., Cell 80: 707-18 (1995)] показали, що коstimulatoryні молекули B7-1 і B7-2 диференційовано активують шляхи розвитку Th1/Th2. [Yi-Qun et al., Int. Immunol. 8: 37-44 (1996)] показали, що для коstimulatoryних сигналів від членів сімейства B7 при їх додаванні до недавно активованих зберігаючих пам'ять Т-клітин є диференціальні вимоги відносно розчинних викликаних з пам'яті антигенів. [Дивися також de Boer et al., Eur J. Immunol. 23: 3120-5(1993)].

Деякі групи висловлюють припущення про альтернативні або окремі рецептор/ліганд взаємодії для CTLA-4 в порівнянні з CD28 і навіть передбачено наявність третього B-7 комплексу, який впізнається антитілом BBI. [Дивися, наприклад, Hathcock et al., Science 262: 905-7 (1993), Freeman et al., Science 262: 907-9 (1993), Freeman et al., J. Exp. Med. 178: 2185-92 (1993), Lenschow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11054-8 (1993), Razi-Wolf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11182-6 (1993) і Boussiotis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11059-63 (1993)]. Однак, [Freeman et al., J. Immunol. 161: 2708-15 (1998)], обговорюють дані про те, що антитіло BBI зв'язує молекулу, яка ідентична поверхово-клітинній формі CD74, і, отже, BB1 mAb зв'язується з білком, відмінним від B7-1, і цей епітоп є також на білці B7-1. Таким чином, це спостереження вимагало перегляду робіт в даній області із застосуванням BB1 mAb при аналізі експресії і функції CD 80.

Починаючи з 1993 року з кульмінацією в 1995 році, дослідники зробили подальше з'ясування ролі CTLA-4 в стимуляції Т-клітин. По-перше, завдяки застосуванню моноклональних антитіл проти CTLA-4 [Walunas et al., Immunity 1: 405-13 (1994)] представили докази того, що CTLA-4 може діяти як негативний регулювальник активації Т-клітин. Після цього Waterhouse et al., Science 270:985-988 (1995) показали, що в лімфатичних вузлах і селезінці дефіцитних по CTLA-4 мишей нагромаджуються Т-лімфобласти з підвищеним рівнем маркерів активації. Т-лімфобласти проникали також в печінкову тканину, тканину серця, легенеvu і панкреатичну тканину, кількість сироваткового імуноглобуліну була підвищеною, а після стимуляції через Т-клітинний рецептор їх Т-клітини проліферували спонтанно і сильно, але вони були схильні до клітинної загибелі, індукованої перехресною зшивкою Fas-рецептора і гама-опроміненням. Waterhouse et al., дійшли висновку, що CTLA-4 діє як негативний регулювальник активації Т-клітин і є життєво важливим для контролю гомеостазу лімфоцитів. У коментарі в тому ж випуску [Allison and Krummel, Science 270: 932-933 (1995)] обговорили роботу Waterhouse et al., як таку, що демонструє те, що CTLA-4 діє, знижуючи відповідь Т-клітин, або володіє гальмовою сигнальною функцією в активації і розвитку Т-клітин. [Tivol et al., Immunity 3: 541-7 (1995)] також створили дефіцитних по CTLA-4 мишей і показали, що у таких мишей швидко розвивається лімфопроліферативне захворювання з мультіорганною лімфоцитарною інфільтрацією і руйнуванням тканини, зокрема, з важким міокардитом і панкреатитом. Вони дійшли висновку, що CTLA-4 грає ключову роль в негативній регуляції активації Т-клітин і підтримці імунологічного гомеостазу. [Krummel et al. and Allison J. Exp. Med. 182: 459-65 (1995)] пізніше з'ясували, що CD28 і CTLA-4 володіють протилежною дією на відповідь Т-клітин на стимуляцію. Вони створили антитіло проти CTLA-4 і досліджували ефекти його скріплення з CTLA-4 в системі з використанням високо очищених Т-клітин. У їх повідомленні було показано, що присутність низьких кількостей B7-2 на свіжоотриманих Т-клітинах може частково гальмувати проліферацію Т-клітин і це гальмування опосередковується взаємодіями з CTLA-4. Зшиття CTLA-4 разом з TCR і CD28 сильно гальмує проліферацію і секрецію ІЛ-2 Т-клітинами. Нарешті, ці результати показали, що CD28 і CTLA-4 передають протилежні сигнали, які, мабуть, підсумовуються Т-клітиною в формуванні відповіді на антиген. Таким чином, вони дійшли висновку, що результат стимуляції рецептора антигенна Т-клітини регулюється коstimulatoryними сигналами CD28, а також гальмовими сигналами, що йдуть від CTLA-4. [Дивися також Krummel et al., Int. Immunol. 8: 519-23 (1996) і патент США №5811097 і заяву на міжнародний патент №WO 97/20574].

Була проведена множина додаткових експериментів для подальшого з'ясування згаданої вище функції CTLA-4. Наприклад, [Walunas et al., J. Exp. Med. 183: 2541-50 (1996)] завдяки застосуванню антитіл проти CTLA-4 передбачили, що сигнали CTLA-4 не регулюють виживаність клітин або відповідь на ІЛ-2, але насправді гальмують залежну від CD28 продукцію ІЛ-2. Також [Perrin et al., J. Immunol. 157: 1333-6 (1996)] показали, що антитіла проти CTLA-4 при експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ) загострюють захворювання і підвищують смертність. Загострення захворювання було пов'язане з підвищеним утворенням енцефалітогенних цитокінів TNF-alpha, IFN-gamma і ІЛ-2. Таким чином, вони дійшли висновку, що CTLA-4 регулює інтенсивність аутоімунної відповіді при ЕАЕ, послаблюючи утворення запального цитокіну і клінічні вияви захворювання. [Дивися також Hurwitz et al., J Neuroimmunol 73: 57-62 (1997) і Saper et al., J. Exp. Med. 188: 199-204 (1998)] (анти-CTLA-4 шпильковий рибозим, який специфічно блокує експресію CTLA-4 після трансфекції гена на моделі мишачих Т-клітин).

Крім того, [Blair et al., J. Immunol. 160: 12-5 (1998)] оцінили функціональні впливи групи моноклональних антитіл (mAbs) на CTLA-4 на CD4+ клітинах, що покояться. Їх результати показали, що деякі моноклональні антитіла до CTLA-4 можуть гальмувати проліферативні відповіді CD4+ клітин, що покояться і перехід клітинного

циклу з фази G0 в фазу G1. Інгібіторні ефекти CTLA-4 були очевидними в межах 4 год, в час, коли експресія CTLA-4 на поверхні клітини залишається такою, що не визначається. Однак інші CTLA-4 mAbs не мали інгібіторних ефектів, що вказує на те, що скріплення mAbs з CTLA-4 саме по собі не досить для опосередкування негативної регуляції Т-клітинних відповідей. Цікаво, що поки продукція ІЛ-2 була вимкнена, інгібіторні анти-CTLA-4 mAbs допускали індукцію і експресію гена виживання клітин bcl-X(L). Відповідно до даного спостереження клітини залишалися життєздатними, і після скріплення CTLA-4 апоптоз не визначався.

У зв'язку з анергією [Perez et al., Immunity 6:411-7 (1997)] показали, що індукція анергії Т-клітин запобігалася шляхом блокування CTLA-4, і вони дійшли висновку, що вихід впізнавання антигена Т-клітинами визначається шляхом взаємодії CD28 або CTLA-4 на Т-клітинах з молекулами B7. Також [Van Parijs et al., J. Exp. Med. 186: 1119-28 (1997)] досліджували роль інтерлейкіну 12 і коstimуляторів в анергії Т-клітин in vivo і знайшли, що при інгібуванні скріплення CTLA-4 при індукції анергії проліферація Т-клітин блокувалася, і не стимулювалася остаточне диференціювання Th1. Однак Т-клітини, піддані дії толерогенного антигена в присутності як ІЛ-12, так і анти-CTLA-4 антитіла, не ставали анергічними і поводитися ідентично Т-клітинам, які зустрічалися з імуногенним антигеном. Ці результати передбачали, що in vivo в індукцію анергії вносять внесок два процеси: зустріч з CTLA-4, яка веде до блокади здатності Т-клітин проліферувати і відсутність цитокіну запального типу, ІЛ-12, який запобігає диференціюванню Т-клітин в Th1 ефекторні клітини. Поєднання ІЛ-12 і анти-CTLA-4 антитіла було достатнім для перетворення звичайно толерантного стимулу в імуногенний.

Відносно інфекцій [McCoey et al., J. Exp. Med. 186: 183-7 (1997)] показали, що анти-CTLA-4 антитіла істотно збільшують і прискорюють Т-клітинну імунну відповідь на *Nippostrongylus brasiliensis*, що веде до значного зниження кількості дорослих особів і ранньому закінченню відкладення яєць паразитами. [Дивися також Murphy et al., J. Immunol. 161: 4153-4160 (1998) (Leishmania donovani)].

Відносно рака [Kwon et al., PNAS USA 94: 8099-103 (1997)] розробили модель сингенного рака простати мишей і вивчили два окремих впливи, призначених для з'ясування відповіді, направленої проти рака простати, через посилену коstimуляцію Т-клітин: (i) забезпечення прямої коstimуляції клітинами рака простати з трансдукованою експресією ліганду B7.1 і (ii) опосередкована антитілом блокада in vivo CTLA-4 Т-клітин, яка запобігає негативній регуляції Т-клітин. Було показано, що опосередкована антитілом блокада in vivo CTLA-4 посилює імунні відповіді проти рака простати. Також [Young et al., Cancer Res 57: 4036-41 (1997)] досліджували, чи веде блокада функції CTLA-4 до підвищення протиракових відповідей Т-клітин на різних стадіях пухлинного зростання. На основі результатів, отриманих in vitro і in vivo, вони виявили, що блокада CTLA-4 в індивідуумів, хворих на рак, підвищує здатність генерувати протиракові ефекти Т-клітин, але вираженість такої посилюючої дії була обмежена ранніми стадіями пухлинного зростання в їх моделі. Додатково [Hurwitz et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 10067-71 (1998)] досліджували залежність генерації опосередкованого Т-клітинами протипухлинної відповіді від зустрічі рецептора Т-клітин з головним комплексом гістосумісності/антигеном, а також від скріплення CD28 з B7. Деякі пухлини, такі як карцинома молочної залози SM1, не піддавалися аНТН-CTLA-4 імунотерапії. Так, завдяки застосуванню поєднання блокади CTLA-4 і вакцини, що складається з SM1 клітин, експресуючих колонієстимулюючий фактор, гранулоцитів-макрофагів, спостерігалася регресія початкових пухлин SM1, незважаючи на неефективність будь-якого лікування, що застосовується окремо. Ця спільна терапія приводила до тривалої імунної реакції по відношенню до SM1 і залежала як від CD4(+), так і від CD8(+) Т-клітин. Результати дозволили передбачити, що блокада CTLA-4 діє на рівні антиген-представляючих клітин господаря.

Відносно діабету [Luhder et al., J. Exp. Med. 187: 427-32 (1998)] вводили mAb проти CTLA-4 трансгенним по TCR мишам, що моделюють діабет на різних стадіях захворювання. Вони виявили, що зустріч CTLA-4 в момент, коли потенційно діабетогенні Т-клітини активуються уперше, є центральною подією; якщо зустріч забезпечується, то відбувається інвазія острівців, але вона залишається абсолютно нешкідливою протягом місяців. Якщо цього не відбувається, то інсульт стає набагато більш агресивним і швидко розвивається діабет.

У зв'язку з імунізацією вакциною [Horspool et al., J. Immunol. 160: 2706-14 (1998)] виявили, що інтактне mAb проти CTLA-4, але не Fab фрагменти, придушує первинну гуморальну відповідь на pC1A/beta gal, не торкаючись відповідей, що викликаються з пам'яті, що вказує на те, що активація CTLA-4 гальмує утворення антитіл, але не праймінг Т-клітин. Блокада лігандів для CD28 і CTLA-4, CD80 (B7-1) і CD86 (B7-2), виявила окрему функцію, яка не перекривається. Блокада CD80 при початковій імунізації повністю блокувала первинні і повторні відповіді антитіл, тоді як блокада CD86 придушувала первинні, але не повторні відповіді. Одночасна блокада CD80+CD86 була менш ефективною при придушенні відповідей антитіл, ніж блокада будь-якого окремо. Посилення коstimуляції за допомогою спільного введення експресуючих B7 плазмід збільшувало відповіді CTL, але не відповіді антитіл, і не було отримано вказівок на зміщення Th1 в бік Th2. Ці дані дозволяють передбачати складні і окремі функції для CD28, CTLA-4, CD80 і CD86 при коstimуляції Т-клітин після вакцинації нуклеїновою кислотою.

У зв'язку з відторгненням алотрансплантату [Markees et al., J Clin Invest 101: 2446-55 (1998)] виявили на мишачій моделі відторгнення шкіряного алотрансплантату, що приживаність початково залежить від присутності IFN-gamma, CTLA-4 і CD4(+) Т-клітин. Додавання в схему протоколу mAb проти CTLA-4 або проти IFN-gamma було пов'язане з швидким відторгненням трансплантата, тоді як mAb проти ІЛ-4 не надавали дії.

У зв'язку з вивченням ролі CTLA-4 відносно CD28 [Fallarino et al., J. Exp. Med. 188: 205-10 (1998)] створили трансгенних мишей по TCR з дефектним активуючим рекомбіназу геном 2 і CD28 дикого типу або дефектним CD28, яких імунізували експресуючою антигенною пухлиною. Праймовані Т-клітини мишей обох типів продукували цитокіни і проліферували у відповідь на стимуляторні клітини, не експресуючі B7. Однак, в той час як відповідь CD28+/+ Т-клітин посилювався коstimуляцією B7-1, відповідь CD28-/- Т-клітин сильно гальмувалася.

Це гальмування знімалося моноклональними антитілами проти B7-1 або CTLA-4. Таким чином, CTLA-4 може значно гальмувати активацію Т-клітин у відсутність CD28, що вказує на те, що антагонізм опосередкованого TCR сигналу достатній для пояснення гальмової дії CTLA-4. Схожим образом, [Lin et al., J. Exp. Med. 188: 199-204 (1998)] вивчали відторгнення серцевих алотрансплантатів у мишей, дефектних по CD28. Серця H-2(q) трансплантували алогенним мишам дикого типу або дефектним по CD28 (H-2(b)). Відторгнення трансплантата у дефектних по CD28 мишей відбувалося пізніше, ніж у мишей дикого типу. Обробка реципієнтів дикого типу CTLA-4-імуноглобуліном (Ig) або mAbs проти B7-1 плюс mAbs проти B7-2 значно продовжувала виживання алотрансплантата. Навпаки, обробка дефектних по CD28 мишей CTLA-4-Ig/ mAbs проти B7-1 плюс mAbs проти B7-2 або блокуючим mAb проти CTLA-4 спричиняла прискорення відторгнення алотрансплантата. Ця підвищена швидкість відторгнення алотрансплантата була пов'язана з більш сильною інфільтрацією моноядерних клітин і підвищеним рівнем транскриптів IFN-gamma і IL-6 в серцях донорів у необроблених мишей дикого типу і у дефектних по CD28 мишей, оброблених CTLA-4-Ig або mAb проти CTLA-4. Таким чином, негативна регуляторна роль CTLA-4 виходить за межі здатності запобігати активації CD28 за допомогою лігандної конкуренції. Навіть у відсутності CD28 CTLA-4 грає інгібіторну роль в регуляції відторгнення алотрансплантату.

Досліджували також додаткові характеристики експресії CTLA-4. Наприклад, [Alegre et al., J. Immunol. 157: 4762-70 (1996)] передбачили, що CTLA-4 поверхні швидко інтерналізується, що може пояснити низький рівень експресії, що звичайно визначається на клітинній поверхні. Вони дійшли висновку, що CD28 і IL-2 грають важливу роль в підвищенні експресії CTLA-4. Крім того, акумуляція CTLA-4 на клітинній поверхні, мабуть, регулюється головним чином за рахунок його швидкого ендоцитозу. Також [Castan et al., Immunology 90: 265-71 (1997)] на основі імуногістохімічного аналізу експресії CTLA-4 in situ передбачили, що Т-клітини зародкового центра, які є CTLA-4-позитивними, могли б бути важливими для імунної регуляції.

Відповідно, в світлі широкої і важливої ролі, яку CTLA-4, мабуть, грають в імунній відповіді, було б бажано створити антитіла до CTLA-4, які можуть бути ефективно застосовані в імунотерапії. Більш того було б бажано створити антитіла проти CTLA-4, які можуть бути застосовані при хронічних захворюваннях, при яких потрібні повторні введення антитіл.

На Фіг.1 представлена серія нуклеотидних і амінокислотних послідовностей важкого ланцюга і легкого капа ланцюга імуноглобулінових молекул відповідно до винаходу: 4.1.1 (Фіг.1A), 4.8.1 (Фіг.1B), 4.14.3 (Фіг.1C), 6.1.1 (Фіг.1D), 3.1.1 (Фіг.1E), 4.10.2 (Фіг.1F), 2.1.3 (Фіг.1G), 4.13.1 (Фіг.1H), 11.2.1 (Фіг.1I), 11.6.1 (Фіг.1J), 11.7.1 (Фіг.1K), 12.3.1.1 (Фіг.1L) і 12.9.1.1 (Фіг.1M).

На Фіг.2 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями важкого ланцюга клонів 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1 і амінокислотою послідовністю батьківської лінії DP-50 (3-33). Відмінності між послідовністю батьківської лінії DP-50 і тією ж послідовністю в клонах позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіл у вигляді затінення.

На Фіг.3 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями важкого ланцюга клону 2.1.3 і амінокислотою послідовністю батьківської лінії DP-65 (4-31). Відмінності між послідовністю батьківської лінії DP-65 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.4 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клонів 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 і 4.13.1 і амінокислотою послідовністю батьківської лінії A27. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A27 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення. Уявні делеції в CDR1s клонів 4.8.1, 4.14.3 і 6.1.1 позначені як "0s".

На Фіг.5 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клонів 3.1.1, 11.2.1, 11.6.1 і 11.7.1 і амінокислотою послідовністю батьківської лінії 012. Відмінності між послідовністю батьківської лінії 012 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.6 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клону 2.1.3 і амінокислотою послідовністю батьківської лінії A10/A26. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A10/A26 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.7 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клону 12.3.1 і амінокислотою послідовністю батьківської лінії A17. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A17 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.8 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клону 12.9.1 і амінокислотою послідовністю батьківської лінії A3/A 19. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A3/A 19 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.9 представлене узагальнення N-кінцевих амінокислотних послідовностей, отриманих за допомогою прямого білкового секвенування важкого і легкого ланцюгів антитіл.

На Фіг.10 представлена певна додаткова інформація, що характеризує деякі з антитіл відповідно до даного винаходу. На Фіг.10A підсумовані дані, що відносяться до клонів 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.14.3 і 6.1.1. Представлені дані, що відносяться до концентрації, ізоелектричного фокусування (ІЕФ), ДДС-На-ПАГЕ, розмірно-ексклюзійної хроматографії (SEC), рідинної хромато/масс-спектроскопії (PХМС), мас-спектроскопії

(MALD1), N-кінцевим послідовностям легких ланцюгів. Додаткова докладна інформація, що відноситься до ІЕФ, представлена на Фіг.10В; що відноситься до ДЦС-На-ПААГ, представлена на Фіг.10С; і SEC антитіла 4.1.1 на Фіг.10D.

На Фіг.11 представлена експресія B7-1 і B7-2 на клітинах Raji із застосуванням mAbs проти CD-80-PE і CD86-PE.

На Фіг.12 представлено залежне від концентрації збільшення продукції ІЛ-2 в тесті Т-лімфобластів/Raji, індуковане блокуючими антитілами проти CTLA-4 (BN13, 4.1.1, 4.8.1 і 6.1.1).

На Фіг.13 представлено залежне від концентрації збільшення продукції IFN- γ в тесті Т-лімфобластів/Raji, індуковане блокуючими антитілами проти CTLA-4 (BN13, 4.1.1, 4.8.1 і 6.1.1) (той же донор Т-клітин).

На Фіг.14 представлено середнє збільшення продукції ІЛ-2 Т-клітинами від 6 донорів, індуковане антитілами, що блокують проти CTLA-4, в тесті Т-лімфобластів/Raji.

На Фіг.15 представлено середнє збільшення продукції IFN- γ Т-клітинами від 6 донорів, індуковане блокуючими антитілами проти CTLA-4, в тесті Т-лімфобластів/Raji.

На Фіг.16 представлено збільшення продукції ІЛ-2 в hPBMC від 5 донорів, індуковане блокуючими mAbs проти CTLA-4, виміряне через 72 години після стимуляції SEA.

На Фіг.17 представлено збільшення продукції ІЛ-2 в суцільній крові від 3 донорів, індуковане блокуючими mAbs проти CTLA-4, виміряне через 72 і 96 годин після стимуляції SEA.

На Фіг.18 представлено гальмування зростання пухлини антитілами проти CTLA-4 миші в мишачій пухлинній моделі фібросаркоми.

На Фіг.19 представлено збільшення продукції ІЛ-2, індуковане антитілами проти CTLA-4 (4.1.1 і 11.2.1) даного винаходу, через 72 години в тестах Т-лімфобластів/Raji і суперантигену (суцільна кров і моноядерні клітини периферичної крові від 6 донорів).

На Фіг.20 представлено дозозалежне збільшення продукції ІЛ-2, індуковане антитілами проти CTLA-4 (4.1.1 і 11.2.1) даного винаходу, через 72 години в тесті Т-лімфобластів/Raji.

На Фіг.21 представлено дозозалежне збільшення продукції ІЛ-2, індуковане антитілами проти CTLA-4 (4.1.1 і 11.2.1) даного винаходу, через 72 години в тесті суперантигену з суцільною кров'ю при стимуляції 100нг/мл суперантигену.

На Фіг.22 представлені серії додаткових нуклеотидних і амінокислотних послідовностей наступних ланцюгів антитіла проти CTLA-4: повнорозмірний важкий ланцюг 4.1.1 (кДНК 22(a)), геномна ДНК 22(b) і амінокислотна послідовність 22(c), повнорозмірний деглікозильований важкий ланцюг 4.1.1 (кДНК 22(d)), і амінокислотна послідовність 22(e), легкий ланцюг 4.1.1 (кДНК 22(f)), і амінокислотна послідовність 22(g), повнорозмірний важкий ланцюг 4.8.1 (кДНК 22(h)), і амінокислотна послідовність 22(i), легкий ланцюг 4.8.1 (кДНК 22(j)), і амінокислотна послідовність 22(k), повнорозмірний важкий ланцюг 6.1.1 (кДНК 22(l)), і амінокислотна послідовність 22(m), легкий ланцюг 6.1.1 (кДНК 22(n)), і амінокислотна послідовність 22(про), повнорозмірний важкий ланцюг 11.2.1 (кДНК 22(p)), і амінокислотна послідовність 22(q) і легкий ланцюг 11.2.1 (кДНК 22(r)), і амінокислотна послідовність 22(s).

Відповідно до першого варіанту даного винаходу пропонується антитіло, яке здатне зв'язувати CTLA-4, що включає амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, яка включає прилеглу амінокислотну послідовність від послідовності FR1 до послідовності FR3 включно, що кодується сімейством генів людини V_H3-33, і яка включає, щонайменше, одну з амінокислотних замін в послідовностях CDR1, послідовностях CDR2 або рамках послідовностей, представлених на Фіг.2. В переважному здійсненні амінокислотна послідовність включає послідовність, яку вибирають з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 і SEQ ID NO: 70. В іншому переважному здійсненні антитіло додатково включає амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, включаючи послідовність, яку вибирають з групи, що складається з послідовностей, що включає SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69 і SEQ ID NO: 71.

Відповідно до другого варіанту даного винаходу пропонується антитіло, що включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 1 і амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 14.

Відповідно до третього варіанту даного винаходу пропонується антитіло, що включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 2 і амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 15.

Відповідно до четвертого варіанту даного винаходу пропонується антитіло, що включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 4 і амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 17.

Відповідно до п'ятого варіанту даного винаходу пропонується виділене моноклональне антитіло людини, яке здатне взаємодіяти з CTLA-4. У переважному здійсненні антитіло здатне конкурувати за скріплення з CTLA-4 з антитілом, яке вибирають з групи, що складається з 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1. В іншому переважному здійсненні антитіло володіє по суті схожою специфічністю скріплення з CTLA-4, що і антитіло, яке вибирають з групи, що складається з 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1. В іншому переважному здійсненні антитіло вибирають з групи, що складається з 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1,

11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1. В іншому переважному здійсненні антитіло не реагує перехресно з CTLA-4 нижчих видів ссавців, переважно нижчі види ссавців включають мишу, пацюка і кролика і більш переважно мишу і пацюка. В іншому переважному здійсненні антитіло реагує перехресно з CTLA-4 приматів, переважно примати включають довгохвостих макак і макак-резус. В іншому переважному здійсненні антитіло володіє вибірковістю у відношенні CTLA-4 в порівнянні з CD28, B7-2, CD44 і hlgG1, більш ніж приблизно 100:1 і переважно приблизно 500:1 або більше. В іншому переважному здійсненні спорідненість скріплення антитіла становить приблизно 10^{-9} М або вище і переважно приблизно 10^{-10} М або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло гальмує скріплення між CTLA-4 і B7-2 з IC_{50} менше, ніж приблизно 100нМ і переважно менше, ніж приблизно 0,38нМ. В іншому переважному здійсненні антитіло гальмує скріплення між CTLA-4 і B7-1 з IC_{50} менше, ніж приблизно 100нМ або вище і переважно менше, ніж приблизно 0,50нМ. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію ІЛ-2 в тесті Т-лімфобластів/Raji на приблизно 500пг/мл або вище і переважно на приблизно 3846пг/мл або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію IFN- γ в тесті Т-лімфобластів/Raji на приблизно 500пг/мл або вище і переважно на приблизно 1233пг/мл або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію ІЛ-2 в тесті суперантигену в hPBMC або суцільній крові на приблизно 500пг/мл або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію ІЛ-2 в тесті суперантигену в hPBMC або суцільній крові на приблизно 500пг/мл або переважно на 1500пг/мл або вище, або вище ніж на приблизно 30% або переважно на 50% по відношенню до контролю.

Відповідно до шостого варіанту даного винаходу пропонується гуманізоване (наближене до людського) антитіло, яке володіє по суті схожою специфічністю скріплення з CTLA-4, що і антитіло, яке вибирають з групи, що складається з 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1. У переважному здійсненні антитіло не реагує перехресно з CTLA-4 нижчих видів ссавців, переважно нижчі види ссавців включають мишу, пацюка і кролика і переважно мишу і пацюка. В іншому переважному здійсненні антитіло реагує перехресно з CTLA-4 приматів, переважно примати включають довгохвостих макак і макак-резус. В іншому переважному здійсненні антитіло володіє вибірковістю по відношенню до CTLA-4 в порівнянні з CD28, B7-2, CD44 і hlgG1, більш ніж приблизно 100:1 і переважно приблизно 500:1 або більше. В іншому переважному здійсненні спорідненість скріплення антитіла становить приблизно 10^{-9} М або вище і переважно приблизно 10^{-10} М або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло гальмує скріплення між CTLA-4 і B7-2 з IC_{50} менше, ніж приблизно 100нМ і переважно менше, ніж приблизно 0,38нМ. В іншому переважному здійсненні антитіло гальмує скріплення між CTLA-4 і B7-1 з IC_{50} менше, ніж приблизно 100нМ або вище і переважно менше, ніж приблизно 0,50нМ. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію ІЛ-2 в тесті Т-лімфобластів/Raji на приблизно 500пг/мл або вище і переважно на приблизно 3846пг/мл або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію IFN- γ в тесті Т-лімфобластів/Raji на приблизно 500пг/мл або вище і переважно на приблизно 1233пг/мл або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію ІЛ-2 в тесті суперантигену в hPBMC або суцільній крові на приблизно 500пг/мл або вище. В іншому переважному здійсненні антитіло збільшує продукцію ІЛ-2 в тесті суперантигену в hPBMC або суцільній крові на приблизно 500пг/мл або переважно на 1500пг/мл або вище, або вище ніж на приблизно 30% або переважно 50% по відношенню до контролю.

Відповідно до сьомого варіанту даного винаходу пропонується антитіло, яке взаємодіє з CTLA-4, що включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, яка включає послідовності FR1, FR2 і FR3 людини, що кодується сімейством генів людини V_H 3-33, оперативно пов'язану в рамці з послідовністю CDR1, CDR2 і CDR3, причому послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 незалежно вибирають з послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3, представлених на Фіг.2. В переважному здійсненні антитіло за п. 32 додатково включає будь-яку з соматичних мутацій в послідовностях FR1, FR2 і FR3, як продемонстровано на Фіг.2.

Відповідно до восьмого варіанту даного винаходу пропонується антитіло, яке взаємодіє з CTLA-4, що включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, яка включає послідовності FR1, FR2 і FR3 людини, що кодується сімейством генів людини V_H 3-33, оперативно пов'язану в рамці з послідовністю CDR1, CDR2 і CDR3, причому антитіло має наступні властивості: спорідненість скріплення по відношенню до CTLA-4 приблизно 10^{-9} або вище; гальмування скріплення між CTLA-4 і B7-1 з IC_{50} приблизно 100нМ або менше; гальмування скріплення між CTLA-4 і B7-2 з IC_{50} приблизно 100нМ або менше; і збільшення продукції цитокінів в тесті Т-клітин людини на 500пг/мл або вище.

Відповідно до дев'ятого варіанту даного винаходу пропонується антитіло, яке взаємодіє з CTLA-4, що включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, яка включає послідовності FR1, FR2 і FR3, оперативно пов'язану в рамці з послідовністю CDR1, CDR2 і CDR3, яку незалежно вибирають з послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3, представлених на фігурах 2 і 3, причому антитіло має наступні властивості: спорідненість скріплення по відношенню до CTLA-4 приблизно 10^{-9} або вище; гальмування скріплення між CTLA-4 і B7-1 з IC_{50} приблизно 100нМ або менш; гальмування скріплення між CTLA-4 і B7-2 з IC_{50} приблизно 100нМ або менш; і збільшення продукції цитокінів в тесті Т-клітин людини на 500пг/мл або вище.

Відповідно до десятого варіанту даного винаходу пропонується система культур клітин для визначення стимуляції Т-клітин, що включає культуру Т-лімфобластів людини, що співкультивується з клітинною лінією Raji. У переважному здійсненні Т-лімфобласти промивають перед культивуванням з клітинною лінією Raji.

Відповідно до одинадцятого варіанту даного винаходу пропонується метод вимірювання стимуляції Т-клітин, що включає: надання культури Т-лімфобластів людини і клітинної лінії Raji; контактування культури з агентом; і вимірювання продукції цитокінів культурою.

Відповідно до дванадцятого варіанту даного винаходу пропонується функціональний метод скринінгу частини

зі стимуляторною функцією відносно Т-клітин, що включає: надання культури Т-лімфобластів людини і клітинної лінії Raji; контактування культури з даною частиною; і вимірювання продукції цитокінів культурою.

Відповідно до тринадцятого варіанту даного винаходу пропонується тест Т-клітинної стимуляції для оцінки інгібіторної функції CTLA-4, що включає: контактування культури, що включає Т-лімфобласти людини і клітинну лінію Raji, з агентом і визначення продукції цитокінів культурою.

Відповідно до чотирнадцятого варіанту даного винаходу пропонується спосіб скринінгу агента на стимуляторну активність відносно Т-клітин, що включає: контактування агента з клітинною культурою, що включає Т-лімфобласти людини і клітинну лінію Raji; і визначення продукції цитокінів культурою.

У кожному з варіантів з десятого по чотирнадцятий даного винаходу в переважному здійсненні Т-лімфобласти промивають перед культивуванням з клітинною лінією Raji. У іншому переважному здійсненні цитокін являє собою ІЛ-2 або ІFN- γ . У переважному здійсненні агент являє собою антитіло і переважно взаємодіє з CTLA-4.

Відповідно до п'ятнадцятого варіанту даного винаходу пропонується тест для вимірювання стимуляції Т-клітин, що включає: надання популяції моноклеарних клітин периферичної крові людини (hPBMC) або суцільної крові людини, стимульованої ентеротоксином А стафілокока; контактування культури з агентом; і вимірювання продукції цитокінів популяцією клітин.

Відповідно до шістнадцятого варіанту даного винаходу пропонується функціональний тест для скринінгу частини зі стимуляторною функцією відносно Т-клітин, що включає: надання популяції моноклеарних клітин периферичної крові людини або суцільної крові людини, стимульованої ентеротоксином А стафілокока; контактування культури з даною частиною; і визначення продукції цитокінів популяцією клітин.

Відповідно до сімнадцятого варіанту даного винаходу пропонується тест Т-клітинної стимуляції для оцінки інгібіторної функції CTLA-4, що включає контактування популяції моноклеарних клітин периферичної крові людини або суцільної крові людини, стимульованої ентеротоксином А стафілокока, з агентом і визначення продукції цитокінів популяцією клітин.

Відповідно до вісімнадцятого варіанту даного винаходу пропонується спосіб скринінгу агента на стимуляторну активність відносно Т-клітин, що включає: контактування агента з популяцією моноклеарних клітин периферичної крові людини або з суцільною кров'ю людини, стимульованих ентеротоксином А стафілокока; і визначення продукції цитокінів популяцією клітин.

У кожному з п'ятнадцятого по вісімнадцятий варіанти даного винаходу в переважному здійсненні цитокін являє собою ІЛ-2. У іншому переважному здійсненні продукцію цитокінів вимірюють в супернатанті, виділеному з культури. У переважному здійсненні агент являє собою антитіло і переважно взаємодіє з CTLA-4.

Відповідно до даного винаходу пропонуються повністю людські моноклональні антитіла проти CTLA-4 людини. Пропонуються нуклеотидні послідовності, що кодують амінокислотні послідовності, що включають важкий і легкий ланцюги молекул імуноглобуліну, зокрема, послідовності, відповідні близьким ним послідовностям важкого і легкого ланцюгів від FR1 і CDR1 до CDR3 і FR4 включно. Далі пропонуються антитіла, що володіють схожими зв'язуючими властивостями, і антитіла (або інші антагоністи), що володіють функціями, схожими з функціями розкритих тут антитіл. Пропонуються також гібридоми, що експресують такі імуноглобулінові молекули і моноклональні антитіла.

Визначення

Якщо це не визначене тут інакше, наукові і технічні терміни, що застосовуються в зв'язку з даним винаходом, повинні мати значення, які загальнозрозумілі для фахівців. Далі, якщо це не мається на увазі контекстом, окремі терміни повинні включати множини і множинні терміни повинні включати окремі. Загалом, використані тут номенклатури і способи, що застосовуються у відносинах з клітинною і тканинною культурою, молекулярною біологією, а також білковою і оліго- або полінуклеотидною хімією і гібридизацією, добре відомі і загальноприйняті в техніці. Для рекомбінантної ДНК, синтезу олігонуклеотидів, клітинної культури і трансформації застосовуються стандартні способи (наприклад, електропорація, ліпофекція). Ферментативні реакції і способи очищення здійснюють відповідно до вказівок виробника або як це звичайно виготовляється в техніці, або як тут описано. Вказані вище способи і процедури звичайно проводять відповідно до традиційних способів, добре відомих в техніці, і як описано в різних загальних і більш спеціальних посиланнях, які цитуються і обговорюються в ході даного опису. Дивися, [наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))], яка включена тут як посилання. Номенклатури, що використовуються тут і лабораторні процедури і способи, що застосовуються в зв'язку з аналітичною хімією, синтетичною органічною хімією і медичною і фармацевтичною хімією, добре відомі і загальноприйняті в техніці. Для хімічних синтезів, хімічних аналізів, отримання фармацевтичних препаратів, їх складання і доставки, а також лікування хворих застосовують стандартні способи.

Якщо це спеціально не вказане інакше, під наступними термінами, що застосовуються відповідно до даного розкриття, потрібно розуміти наступні значення:

Термін "виділений полінуклеотид", що застосовується тут буде означати полінуклеотид геномного, кДНК або синтетичного походження або їх певне поєднання, причому "виділений полінуклеотид" внаслідок свого походження (1) не пов'язаний з цілим або з частиною полінуклеотиду, в якому "виділений полінуклеотид" знаходиться в природних умовах, (2) операційно пов'язаний з полінуклеотидом, до якого він не приєднаний в природних умовах або (3) не існує в природі у вигляді частини більш довгої послідовності.

Термін "виділений білок", що застосовується тут означає білок, що кодується кДНК, рекомбінантною РНК, або синтетичного походження або що визначається їх певним поєднанням, причому "виділений білок" внаслідок

UA 76936
свого походження або джерела походження (1) не пов'язаний з білками, виявленими в природі, (2) вільний від білків з того ж джерела, наприклад, вільний від білків миші, (3) експресується клітинами різних видів або (4) не існує в природі.

5 Термін "поліпептид", що застосовується тут як родове поняття відноситься до нативного білка, фрагментів або аналогів поліпептидної послідовності. Отже, нативний білок, фрагменти і аналоги є видами роду поліпептидів. Переважні поліпептиди відповідно до винаходу включають важкий ланцюг молекул імуноглобулінів людини і легкий капа ланцюг молекул імуноглобулінів людини, представлені на Фіг.1, а також молекули антитіл, що утворюються поєднаннями, що включають важкий ланцюг молекул імуноглобулінів і легкий ланцюг молекул імуноглобулінів, такий як легкий капа ланцюг молекул імуноглобулінів, і навпаки, як і їх фрагменти і аналоги.

10 Термін "існуючий в природі", що застосовується тут відносно об'єкта відноситься до того факту, що об'єкт може бути виявлений в природі. Наприклад, поліпептидна або полінуклеотидна послідовність, присутня в організмі (включаючи віруси), яка може бути виділена з природного джерела і яка не була навмисно модифікована людиною в лабораторії або іншим способом, є "існуючою в природі".

15 Термін "операційно пов'язаний", що застосовується тут відноситься до положень компонентів, що описується таким чином, які дозволяють їм функціонувати властивим ним способом. Керуюча послідовність, "операційно пов'язана" з кодуючою послідовністю таким способом, що при умовах, сумісних з керуючими послідовностями, досягається експресія кодуючої послідовності.

20 Термін "керуюча послідовність", що застосовується тут відноситься до полінуклеотидних послідовностей, які необхідні для забезпечення експресії і процесінгу кодуючих послідовностей, до яких вони приєднані. Природа таких керуючих послідовностей розрізняється в залежності від організму господаря; у прокаріот такі керуючі послідовності звичайно включають промотор, сайт скріплення з рибосомою і послідовність термінації транскрипції; в еукаріот керуючі послідовності звичайно включають промотори і послідовність термінації транскрипції. Термін "керуючі послідовності" призначений для включення, як мінімум, всіх компонентів, присутність яких необхідна для експресії і процесінгу, і може також включати додаткові компоненти, присутність яких корисна, наприклад, лідируючі послідовності і послідовності гібридного партнера.

25 Термін "полінуклеотид", що застосовується тут означає полімерну форму нуклеотидів довжиною, щонайменше, 10 основ, або рибонуклеотидів, або дезоксирибонуклеотидів, або модифікованої форми будь-якого типу нуклеотиду. Термін включає односпіральні і двоспіральні форми ДНК.

30 Термін "олігонуклеотид", що застосовується тут включає існуючі в природі і модифіковані нуклеотиди, пов'язані один з одним існуючими в природі і природно не існуючими олігонуклеотидними зв'язками. Олігонуклеотиди являють собою підгрупу полінуклеотидів, що звичайно має довжину в 200 основ або менш. Переважно олігонуклеотиди мають довжину від 10 до 60 основ і більш переважно довжину від 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 до 40 основ. Олігонуклеотиди звичайно є односпіральними, наприклад, для проб; хоч олігонуклеотиди можуть бути двоспіральними, наприклад, для застосування в конструюванні мутантного гена. Олігонуклеотиди винаходу можуть бути або смисловими, або антисмисловими олігонуклеотидами.

35 Термін "існуючі в природі нуклеотиди", що застосовується тут включає дезоксирибонуклеотиди і рибонуклеотиди. Термін "модифіковані нуклеотиди", що застосовується тут включає нуклеотиди з модифікованими або заміщеними групами цукрів і тому подібне. Термін "олігонуклеотидні зв'язки", що застосовується тут включає такі олігонуклеотидні зв'язки, як фосфортіоатні, фосфодитіоатні, фосфорселеноатні, фосфордиселеноатні, фосфоранілітоатні, фосфораніладатні, фосфорамідні і тому подібне. Дивися, [наприклад, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp.87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., патент США No.5151510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)], відкриття яких включені тут як посилання. Якщо це бажане, олігонуклеотиди можуть включати мітку для їх визначення.

40 Термін "виборче гібридизований", що застосовується тут означає такий, що визначається і специфічно пов'язаний. Полінуклеотиди, олігонуклеотиди і їх фрагменти відповідно до даного винаходу виборчо гібридизуються з ланцюгами нуклеїнових кислот в умовах гібридизації і промивки, які зводять до мінімуму кількість неспецифічного скріплення, що визначається, яке піддається оцінці з нуклеїновими кислотами. Як відомо фахівцям в даній області і як тут обговорюється, можуть бути застосовані дуже суворі умови для досягнення умов виборчої гібридизації. Звичайно гомологія послідовностей нуклеотидів між полінуклеотидами, олігонуклеотидами і фрагментами даного винаходу і цікавлячою послідовністю нуклеотидів повинна бути, щонайменше, 80% і більш типово гомологія, що переважно збільшується, щонайменше, до 85%, 90%, 95%, 99% і 100%. Дві амінокислотні послідовності є гомологічними, якщо між цими послідовностями існує часткова або повна ідентичність. Наприклад, 85% гомологія означає, що 85% амінокислот ідентичні, коли дві послідовності порівнюються на предмет максимального поєднання. Допускаються пропуски (в будь-якій з двох послідовностей, що порівнюються) для максимізації поєднання; причому переважні пропуски довжиною 5 або менш і більш переважні довжиною 2 або менш. В іншому варіанті переважно дві білкові послідовності (або поліпептидні послідовності, або ті, що беруть від них початок поліпептидні послідовності довжиною, щонайменше, 30 амінокислот) є гомологічними в значенні, що застосовується тут, якщо показник поєднання більше за 5 (в одиницях стандартного відхилення), що визначається за допомогою програми ALIGN із застосуванням матриці даних по мутаціях і штрафними очками за пропуски 6-ти або більше. [Дивися Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp.101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) і Supplement 2 до цього тому, pp.1-10]. Дві послідовності або їх частини більш переважно є гомологічними, якщо їх

амінокислоти ідентичні на 50% або більш при оптимальному поєднанні із застосуванням програми ALIGN. Термін "відповідає", що застосовується тут, означає, що послідовність нуклеотидів гомологічна (тобто є ідентичною, не маючи суворого загального еволюційного походження) всій полінуклеотидній послідовності порівняння або її частини, або що полінуклеотидна послідовність ідентична поліпептидній послідовності порівняння. На відміну від цього термін "комплементарна чомусь" застосовується тут для позначення того, що комплементарна послідовність гомологічна всій послідовності полінуклеотидів порівняння або її частини. Наприклад, нуклеотидна послідовність "TATAC" відповідає послідовності порівняння "TATAC" і комплементарна послідовності порівняння "GTATA".

Наступні терміни застосовуються для опису взаємозв'язків послідовностей між двома або більш послідовностями полінуклеотидів або амінокислот: "послідовність порівняння", "вікно порівняння", "ідентичність послідовностей", "процент ідентичності послідовностей" і "значна ідентичність". "Послідовність порівняння" являє собою певну послідовність, що застосовується як основа для порівняння послідовностей; послідовність порівняння може бути частиною більшої послідовності, наприклад, ділянкою повнорозмірної кДНК або послідовності гена, даної в списку послідовностей, або може включати повну послідовність кДНК або гена. Звичайно довжина послідовності порівняння становить, щонайменше, 19 нуклеотидів або 6 амінокислот, частіше, щонайменше, 24 нуклеотида або 8 амінокислот і часто, щонайменше, 48 нуклеотидів або 16 амінокислот. Оскільки дві полінуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть кожна (1) включати послідовність (тобто частина повної полінуклеотидної або амінокислотної послідовності), яка схожа у двох молекул, і (2) можуть додатково включати послідовність, яка розрізняється у двох полінуклеотидних або амінокислотних послідовностей, порівняння послідовностей двох (або більш) молекул для ідентифікації і порівняння локальних районів схожості послідовностей звичайно виконують шляхом порівняння послідовностей двох молекул у "вікні порівняння". Термін "вікно порівняння", що застосовується тут відноситься до концептуальної ділянки з, щонайменше, 18 послідовних положень нуклеотидів або 6 амінокислот, в якому полінуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність можуть порівнюватися з послідовністю порівняння з 18 послідовних положень нуклеотидів або 6 амінокислотних послідовностей, і в якому частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може включати до 20 процентів або менше за добавки, делецій, замін і тому подібне (тобто пропусків) при порівнянні з послідовністю порівняння (яка не включає добавки або делеції) для оптимального поєднання двох послідовностей. За допомогою різних способів вибирають оптимальне поєднання послідовностей для поєднання вікна порівняння, яке може бути проведене за допомогою алгоритму локальної гомології Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), за допомогою алгоритму гомологічного поєднання Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), за допомогою способу пошуку схожості Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), за допомогою комп'ютерних способів здійснення цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Medison, Wis.), Geneworks або MacVector software package), або за допомогою перевірки і найкращого поєднання (тобто ведучого до найбільшого процента гомології у вікні порівняння).

Термін "ідентичність послідовностей" означає, що дві полінуклеотидні або амінокислотні послідовності ідентичні у вікні порівняння (тобто на основі збігу нуклеотиду з нуклеотидом або залишку із залишком). Термін "процент ідентичності послідовностей" розраховують шляхом порівняння двох оптимально суміщених послідовностей у вікні порівняння, визначення числа положень, в яких в обох послідовностях знаходиться ідентична основа нуклеїнових кислот (наприклад, А, Т, С, G, U або I) або залишок для отримання числа парних положень, розподілу числа парних положень на загальне число положень у вікні порівняння (тобто на розмір вікна) і множення результату на 100 для отримання процента ідентичності послідовностей. Термін "значна ідентичність", що застосовується тут означає характеристику полінуклеотидної або амінокислотної послідовності, де полінуклеотидна або амінокислотна послідовність включає послідовність, в якій ідентичність послідовності становить, щонайменше, 85 процентів, переважно, щонайменше, від 90 до 95 процентів, більш звичайно, щонайменше, 99 процентів при порівнянні з послідовністю порівняння у вікні порівняння з, щонайменше, 18 нуклеотидних (6 амінокислотних) положень, де процент ідентичності послідовностей розраховують шляхом порівняння послідовності порівняння з послідовністю, яка може включати делеції або добавки, які становлять сумарно 20 процентів або менше за послідовність порівняння у вікні порівняння. Послідовність порівняння може бути частиною більш великої послідовності.

Назви двадцяти амінокислот, що застосовуються тут і їх аббревіатура відповідають традиційним. Дивися [Immunology - A Synthesis, 2nd Edition, E.S. Gollub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)], яка включена тут як посилання. Стереоізомери (наприклад, D-амінокислоти) двадцяти традиційних амінокислот, не природні амінокислоти, такі як α -, α -дизаміщені амінокислоти, N-алкіламінокислоти, молочна кислота і інші нетрадиційні амінокислоти також можуть бути відповідними компонентами для поліпептидів даного винаходу. Приклади нетрадиційних амінокислот включають: 4-гідроксипролін, γ -карбоксиглутамат, E-N,N,N-триметиллізин, E-N-ацетиллізин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметіонін, 3-метилгістидин, 5-гідроксилізин, o-N-метиларгінін і інші схожі амінокислоти і імінокислоти (наприклад, 4-гідроксипролін). При записі послідовності поліпептиду, що застосовується тут напрям в ліву сторону є напрямом до аміно-кінця, а напрям в праву сторону є напрямом до карбокси-кінця відповідно до угоди і стандартного застосування.

Схожим образом, якщо не обумовлено інакше, лівий кінець одноланцюгових полінуклеотидних послідовностей є 5'-кінцем; напрям в ліву сторону дволанцюгових полінуклеотидних послідовностей позначається як 5'-напрямок. Напрямок добавок зростаючих транскриптів РНК від 5' - до 3'-кінця позначається як транскрипційний напрям; області послідовностей на ланцюги ДНК, які мають ту ж послідовність, що і РНК, і які

є транскриптами РНК всередині 5'-кінця, позначаються як "вищележачі послідовності"; області послідовностей на ланцюги ДНК, які мають ту ж послідовність, що і РНК, і які є транскриптами РНК всередині 3'-кінця, позначаються як "нижчележачі послідовності".

У застосуванні до поліпептидів термін "істотна ідентичність" означає, що дві пептидні послідовності при оптимальному поєднанні, такому як за допомогою програм GAP або BESTFIT із застосуванням ваги негомологічних пропусків, мають послідовності, ідентичні, щонайменше, на 80 процентів, переважно послідовності, ідентичні, щонайменше, на 90 процентів, більш переважно послідовності, ідентичні, щонайменше, на 95 процентів і найбільш переважно послідовності, ідентичні, щонайменше, на 99 процентів. Переважно положення залишків, які не є ідентичними, відрізняються по консервативних замінах амінокислот. Під консервативними замінами амінокислот мається на увазі взаємозамінність залишків, що мають схожі бічні ланцюги. Наприклад, група амінокислот, що мають аліфатичні бічні ланцюги, являє собою гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин; група амінокислот, що мають аліфатичні-гідроксильні бічні ланцюги, являє собою серин і треонін; група амінокислот, що мають амід-утримуючі бічні ланцюги, являє собою аспарагін і глутамін; група амінокислот, що мають ароматичні бічні ланцюги, являє собою фенілаланін, тирозин і триптофан; група амінокислот, що мають основні бічні ланцюги, являє собою лізин, аргінін і гістидін; і група амінокислот, що мають утримуючі сірку бічні ланцюги, являє собою цистеїн і метіонін. Переважні консервативні заміни груп амінокислот являють собою: валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин, лізин-аргінін, аланін-валін, глутамінова-аспарагінова кислота і аспарагін-глутамін.

Як тут обговорюється, мінорні варіації амінокислотних послідовностей антитіл або молекул імуноглобулінів розглядаються як такі, що охоплюються даним винаходом, з умовою, що при варіаціях в послідовності амінокислот зберігається, щонайменше, 75%, більш переважно, щонайменше, 80%, 90%, 95% і найбільш переважно 99% ідентичності. Зокрема, розглядаються консервативні заміни амінокислот. Консервативними замінами є такі, які мають місце всередині сімейства амінокислот, що мають схожі бічні ланцюги. Амінокислоти, що кодуються генетично звичайно поділяють на сімейства: (1) кислі=аспартат, глутамат; (2) основні=лізин, аргінін, гістидін; (3) неполярні=аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан; і (4) незаряджені полярні=тірцін, аспарагін, глутамін, цистеїн, серин, треонін, тирозин. Більш переважними сімействами є: сімейство серину і треоніну з аліфатичними-гідроксильними бічними ланцюгами; сімейство аспарагіну і глутаміну з амід-утримуючими бічними ланцюгами; сімейство аланіну, валіну, лейцину і ізолейцину з аліфатичними бічними ланцюгами; і сімейство фенілаланіну, триптофану і тирозину з ароматичними бічними ланцюгами. Наприклад, логічно передбачити, що ізольована заміна лейцину на ізолейцин або валін, аспартату на глутамат, треоніну на серин або схожа заміна амінокислоти на структурно схожу амінокислоту не повинна мати істотного впливу на скріплення або властивості кінцевої молекули, особливо, якщо в заміну не залучена амінокислота, що знаходиться в місці рамки. Можна легко перевірити, чи буде заміна амінокислоти впливати на функцію пептиду, шляхом визначення специфічної активності похідного пептиду. Методи визначення тут детально описані. Фрагменти або аналоги антитіл або молекул імуноглобулінів можуть бути легко отримані фахівцями в цій області. Переважно, щоб аміно- і карбокси-кінці фрагментів або аналогів знаходилися поблизу кордонів функціональних доменів. Структурні і функціональні домени можуть бути ідентифіковані шляхом порівняння даних послідовностей нуклеотидів і/або амінокислот з опублікованими або власними базами даних. Для ідентифікації мотивів послідовностей або передбаченої конформації доменів білків, які є в інших білках з відомою структурою і/або функцією, переважно застосовують комп'ютеризовані способи порівняння. Відомі способи ідентифікації послідовностей білків, які формують відому трьохмірну структуру. [Bowie et al., Science 253: 164 (1991)]. Таким чином, представлені вище приклади демонструють, що фахівець в даній області може дізнатися мотиви послідовностей і їх структурну конформацію, що може бути використано для визначення структурних і функціональних доменів відповідно до даного винаходу.

Переважними амінокислотними замінами є ті, які: (1) знижують схильність протеолізу, (2) знижують схильність до окислення, (3) змінюють спорідненість скріплення для утворення білкових комплексів, (4) змінюють спорідненість скріплення і (4) додають або модифікують інші фізико-хімічні і функціональні властивості таких аналогів. Аналоги можуть включати різні мутеїни з послідовністю, відмінною від існуючої в природі пептидної послідовності. Наприклад, в існуючій в природі послідовності (переважно в частині поліпептиду, лежачій за межами домену (доменів), утворюючого міжмолекулярні контакти) можуть бути зроблені одиночні або множинні амінокислотні заміни (переважно консервативні амінокислотні заміни). Консервативна амінокислотна заміна не повинна істотно міняти структурні характеристики початкової послідовності (наприклад, замінююча амінокислота не повинна викликати тенденції до порушення спіралі, яка є в початковій послідовності, або руйнувати інші типи повторної структури, характерні для початкової послідовності). Приклади повторних і третинних структур поліпептидів, що розрізняються в техніці описані [в Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (3. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, ; і Thornton et al., Nature 354: 105 (1991)], які включені тут у вигляді посилання.

Термін "поліпептидний фрагмент", що використовується тут відноситься до поліпептиду, що має аміно-кінцеву або карбокси-кінцеву делецію, але в якому амінокислотна послідовність, що залишилася ідентична відповідним положенням існуючої в природі послідовності, визначеної, наприклад, з послідовності повнорозмірної кДНК. Фрагменти звичайно мають довжину, рівну, щонайменше, 5, 6, 8, або 10 амінокислотам, переважно, щонайменше, 14 амінокислотам, більш переважно, щонайменше, 20 амінокислотам, звичайно, щонайменше, 50 амінокислотам, і навіть більш переважно, щонайменше, 70 амінокислотам. Термін "аналог", що застосовується тут відноситься до поліпептидів, що включає сегмент з, щонайменше, 25 амінокислот, який має

значну ідентичність частини розрахованої амінокислотної послідовності і який володіє, щонайменше, однією з наступних властивостей: (1) специфічним скріпленням з CTLA-4 при відповідних для скріплення умовах, (2) здатністю блокувати скріплення CTLA-4 зі своїми рецепторами або (3) здатністю гальмувати зростання експресуючих CTLA-4 клітин *in vitro* або *in vivo*. Звичайно поліпептидні аналоги включають консервативну амінокислотну заміну (або добавку або делецію) в порівнянні з існуючою в природі послідовністю. Аналоги звичайно мають довжину, рівну, щонайменше, 20 амінокислотам, переважно, щонайменше, 50 або більш амінокислотам, і часто можуть мати ту ж довжину, що і повнорозмірний існуючий в природі поліпептид.

Пептидні аналоги звичайно застосовують в фармацевтичній промисловості як непептидні ліки з властивостями, аналогічними властивостям пептиду-зразка. Ці типи непептидних сполук називають "пептидними міметиками" або "пептидоміметиками" [Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber and Freidinger, TINS p.392 (1985); і Evans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)], які включені тут як посилання. Такі сполуки часто розробляються з метою комп'ютеризованого молекулярного моделювання. Пептидні міметики, які структурно схожі з терапевтично корисними пептидами, можуть бути використані для отримання еквівалентного терапевтичного або профілактичного ефекту. Звичайно пептидоміметики структурно схожі з пептидом-образом (тобто поліпептидом, який має біохімічну властивість або фармакологічну активність), таким як людське антитіло, але мають один або більше пептидних зв'язків, необов'язково заміщених зв'язком, який вибирають з групи, що складається з: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (цис і транс), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ і $-\text{CH}_2\text{SO}-$, за допомогою способів, відомих в цій області. Для отримання більш стабільних пептидів може бути використане систематичне заміщення однієї або більше амінокислоти консенсусної послідовності на D-амінокислоту того ж типу (наприклад, D-лізин замість L-лізину). Крім того, за допомогою способів, відомих в цій області, можуть бути створені стислі пептиди, що включають консенсусну послідовність або по суті ідентичний варіант консенсусної послідовності (Rizo and Gierash Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992), включений тут як посилання); наприклад, шляхом додавання внутрішніх цистеїнових залишків, здатних утворювати внутрішньомолекулярні дисульфідні містки, які перетворюють пептид в циклічну форму.

"Антитіло" або "пептид(и) антитіла" відносяться до інтактного антитіла або його зв'язуючого фрагмента, який конкурує з інтактним антитілом за специфічне скріплення. Зв'язуючі фрагменти отримують за допомогою методу рекомбінантної ДНК або за допомогою ферментативного або хімічного розщеплення інтактних антитіл. Зв'язуючі фрагменти включають Fab, Fab', F(ab')₂, Fv і антитіла з одного ланцюга. Антитіло, відмінне від "біспецифічного" або "біфункціонального" антитіла, розуміється як таке, що має ідентичні зв'язуючі центри. Антитіло по суті гальмує взаємодію рецептора з протирецептором, коли надлишок антитіла знижує кількість рецептора, пов'язаного з протирецептором, щонайменше, на приблизно 20%, 40%, 60% або 80% і частіше більш ніж на 85% (при вимірюванні в тесті конкурентного скріплення *in vitro*).

Термін "епітоп" включає будь-яку детермінанту білка, здатну зв'язуватися з імуноглобуліном або рецептором Т-клітин. Епітопні детермінанти звичайно складаються з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як бічні ланцюги амінокислот або цукрів, і звичайно мають специфічні тримірні структурні характеристики, а також специфічні зарядні характеристики. Кажуть, що антитіло специфічно зв'язує антиген, коли константа дисоціації становить <1мкМ, переважно <100нМ, і найбільш переважно <10нМ.

Термін "агент" застосовується тут для позначення хімічної сполуки або суміші хімічних сполук, біологічної макромолекули або екстракту, отриманого з біологічних матеріалів.

Терміни "мітка" і "мічений", що застосовуються тут відносяться до включення маркера, що виявляється, наприклад, шляхом включення радіоактивної амінокислоти або приєднання до поліпептиду біотинільних частин, які можуть бути виявлені за допомогою міченого авідину (наприклад, стрептавідину, що має флуоресцентний маркер або ферментативну активність, яка може бути визначена оптичними або колориметричними способами). У певних ситуаціях мітка або маркер можуть бути також лікарськими. У техніці відомі і можуть бути застосовані різні способи мітки поліпептидів і глікопротеїнів. Приклади міток для поліпептидів включають, але не обмежуються цим, наступне: радіоізотопи і радіонукліди (наприклад, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), флуоресцентні мітки (наприклад, ФІТЦ, родамін, лантанід фосфору), ферментативні мітки (наприклад, пероксидаза хрому, В-галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза), хемілюмінесцентні, біотининільні групи, заздалегідь визначені поліпептидні епітопи, які пізнаються повторним репортером (наприклад, парні послідовності лейцинової застібки, сайти скріплення для повторних антитіл, домени скріплення, металу, епітопні ярлики). В деяких здійсненнях мітку приєднують за допомогою спейсерних груп різної довжини для зниження потенційного стеричного ускладнення).

Термін "фармацевтичний агент або ліки", що застосовується тут відноситься до хімічної сполуки або композиції, здатних викликати бажану терапевтичну дію при правильному введенні хворому. Інші хімічні терміни, що застосовуються тут використовуються відповідно до традиційного застосування в цій області, як це представлено [в The MacGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, Parker, S., Ed., MacGraw-Hill, San Francisco (1985)], включеному тут як посилання.

Термін "антинеопластичний агент", що застосовується тут відноситься до агентів, які володіють функціональною властивістю гальмувати розвиток або прогресію неоплазми у людини, особливо злоякісне (ракове) пошкодження, таке як карцинома, саркома, лімфома або лейкоз. Гальмування метастазів часто є властивістю антинеопластичних агентів.

Термін "в значній мірі чистий", що застосовується тут означає, що вид об'єкта є переважачим присутнім видом (тобто на молярній основі його більше, ніж будь-якого іншого індивідуального виду в композиції) і переважно в значній мірі очищена фракція являє собою композицію, в якій об'єкт виду становить, щонайменше, приблизно 50 процентів (на молярній основі) всіх присутніх макромолекулярних видів. Звичайно в значній мірі

чиста композиція повинна включати більш ніж приблизно 80 процентів всіх макромолекулярних видів, присутніх в композиції, більш переважно, більш ніж приблизно 85%, 90%, 95% і 99%. Найбільш переважно, щоб вид об'єкта був очищений до практично повної гомогенності (забруднюючі види не можуть бути визначені в композиції традиційними способами виявлення), коли композиція складається по суті з єдиного макромолекулярного виду.

Термін хворий включає людину і суб'єкти ветеринарії.

Структура антитіл

Відомо, що основна структурна одиниця антитіл включає тетрамер. Кожний тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара містить один "легкий" (приблизно 25кДа) і один "важкий" ланцюг (приблизно 50-70кДа). Аміно-кінцева частина кожного ланцюга включає варіабельну область з приблизно від 100 до 110 або більше амінокислот, насамперед відповідальну за впізнавання антигену. Карбокси-кінцева частина кожного ланцюга визначає константну область, насамперед відповідальну за ефекторну функцію. Легкі ланцюги людини поділяються на капа і лямбда легкі ланцюги. Важкі ланцюги поділяються на мю, дельта, гамма, альфа або іпсилон і визначають ізотип антитіла як IgM, IgD, IgG, IgA і IgE відповідно. У межах легкого і важкого ланцюгів варіабельні і константні області сполучаються областю "J" з приблизно 12 або більше амінокислот, причому важкий ланцюг включає також область D з приблизно 10 або більше амінокислот. Загалом, [дивися Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press], (включений як посилання у всій повноті для всіх цілей). Варіабельні області кожної пари ланцюгів легкий/важкий утворюють зв'язуючий сайт антитіла.

Таким чином, інтактне антитіло IgG містить два зв'язуючих сайти. За винятком біфункціональних або біспецифічних антитіл, два зв'язуючих сайти є однаковими.

Всі ланцюги виявляють однакову загальну структуру з відносно консервативних рамкових областей (FR), сполучених трьома гіперваріабельними областями, які називають також областями, що визначають комплементарність або CDRs. CDRs з двох ланцюгів кожної пари розташовуються за рахунок рамкових областей, забезпечуючи скріплення зі специфічним епітопом. Від N-кінця до C-кінця як легкий, так і важкий ланцюги включають домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Нумерація амінокислот в кожному домені робиться у відповідності до визначень [Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 і 1991)) або Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989)].

Біспецифічне або біфункціональне антитіло являє собою штучне гібридне антитіло, що володіє двома різними парами важкий/легкий ланцюгів і двома різними зв'язуючими сайтами. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані множиною способів, включаючи злиття гібридом або з'єднання Fab' фрагментів. Дивися, [наприклад, Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)]. Крім того, біспецифічні антитіла можуть бути утворені як "діатіла" [Hollinger et al., "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)] або "Янусини" [Trautenecker et al., "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10: 3655-3659 (1991) і Trautenecker et al., "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int. J. Cancer. Suppl. 7: 51-52 (1992)]. Отримання біспецифічних антитіл може бути відносно трудомістким інтенсивним процесом в порівнянні з отриманням звичайних антитіл, а вихід і міра чистоти біспецифічних антитіл звичайно нижче. Біспецифічні антитіла не існують в формі фрагментів, що містять один зв'язуючий сайт (наприклад, Fab, Fab' і Fv).

Антитіла людини і наближення антитіл до людських

Антитіла людини не викликають проблем, пов'язаних з антитілами, які містять варіабельні і/або константні області миші або пацюка. Наявність таких, що беруть початок від миші або пацюка білків може вести до швидкого кліренсу антитіл і може вести до індукції імунної відповіді у хворого проти такого антитіла. Було постульовано, що для уникнення застосування антитіл, що беруть початок від миші або пацюка можна створити антитіла, наближені до людських (т.зв. "гуманізовані"), або створити повністю людські антитіла шляхом введення функції антитіла людини гризуну, так щоб у гризуна утворювалися антитіла, що мають повністю людські послідовності.

Антитіла людини

Можливість клонувати і реконструювати локуси людини розміром, що вимірюється мільйонами основ, в YACs і вводити їх в статеві клітини миші забезпечує потужний спосіб виявлення функціональних компонентів дуже великих або грубо картованих локусів, а також створення зручних моделей захворювань людини. Більш того застосування такої технології для заміни локусів миші їх людськими еквівалентами могло б дати унікальні відомості про експресію і регуляцію продуктів генів людини під час розвитку, їх зв'язку з іншими системами і їх залученні до індукції і прогресії захворювання.

Важливим практичним додатком такої стратегії є "гуманізація" гуморальної імунної системи миші. Введення миші, в якій ендогенні гени Ig були інактивовані, локусів імуноглобуліну (Ig) людини дає сприятливу можливість вивчити механізми, лежачі в основі програмованої експресії і збирання антитіл, а також їх ролі в розвитку В-клітин. Більш того така стратегія могла б забезпечити ідеальне джерело для отримання повністю людських моноклональних антитіл (Mabs) - важливу віху в напрямі здійснення багатообіцяючої терапії захворювань людини антитілами. Очікується, що повністю людські антитіла зведуть до мінімуму імуногенні і алергічні відповіді, властиві мишачим або таким, що бере початок від миші Mabs, і тим самим підвищать ефективність і безпеку антитіл, що вводяться. Можна чекати, що застосування повністю людських антитіл забезпечить значну перевагу в лікуванні хронічних і захворювань людини, що періодично поновлюються, таких як запалення, аутоімунність і рак, для якого потрібні повторювані введення антитіл.

Одним з підходів до даної мети було генно-інженерне створення ліній мишей з дефіцитом продукції антитіл миші, з великими фрагментами локусів Ig людини в очікуванні того, що такі миші повинні продукувати широкий репертуар антитіл людини у відсутність мишачих антитіл. Великі фрагменти Ig людини повинні зберігати велику різноманітність різних генів, так само як властиву ним регуляцію продукції і експресії антитіл. Завдяки розробці мишачої моделі для створення різноманітності антитіл і їх селекції, а також відсутності імунологічної толерантності до білків людини, виробництво набору антитіл людини такими лініями мишей повинне вести до отримання високоафінних антитіл проти будь-якого цікавлячого антигена, включаючи антигени людини. Антиген-специфічні Mabs людини з бажаною специфічністю можна легко отримати і відібрати, застосовуючи технологію гібридом.

Ця загальна стратегія була продемонстрована в зв'язку з створенням заявниками перших ліній XenoMouse™, як опубліковано в 1994 році. [Дивися Green et al., Nature Genetics 7: 13-21 (1994)]. Лінії XenoMouse™ були створені генно-інженерним способом із застосуванням штучних хромосом дріжджів (YACs), що містять конфігураційні фрагменти локусу важкого ланцюга людини і локусу легкого капа ланцюга розміром, 245т.п.о. і 190т.п.о. відповідно, які містили каркас послідовностей варіабельного і константного районів (там же). Ig людини, що пропонуються, які містять YACs, є сумісними з мишачою системою, як для реконструкції, так і експресії антитіл і здатні замінити інактивовані гени Ig миші. Це було продемонстроване по їх здатності індукувати вироблення В-клітин, продукувати набір повністю людських антитіл, подібний тому, що є у дорослої людини, і генерувати антиген-специфічні Mabs людини. Ці результати також передбачали, що введення більш великих порцій локусів Ig людини, що містять більше число V-генів, додаткових регуляторних елементів і константних районів Ig людини, повинно повторювати по суті повний набір, який характерний для гуморальної відповіді людини на інфекцію і імунізацію. Робота Green et al. була недавно розширена до представлення набору антитіл людини, більшого, ніж 80%, шляхом введення зародкової конфігурації фрагментів YAC локусів важкого ланцюга людини і локусів легкого капа ланцюга розміру в мільйон основ, відповідно, для отримання мишей XenoMouse™. [Дивися Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998) і патентну заявку США No.08/759620, зареєстровану 3 грудня 1996 року], розкриття яких включені тут як посилання.

Такий підхід додатково обговорюється і [описується в патентних заявках США №№07/466008, зареєстрованої 12 січня 1990р., 07/610515, зареєстрованої 8 листопада 1990р., 07/919297, зареєстрованої 24 липня 1992р., 07/922649, зареєстрованої 30 липня 1992р., зареєстрованої 08/031801, зареєстрованої 15 березня 1993р., 08/112848, зареєстрованої 27 серпня 1993р., 08/234145, зареєстрованої 28 квітня 1994р., 08/376279, зареєстрованої 20 січня 1995р., 08/430938, 27 квітня 1995р., 08/464584, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/464582, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/463191, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/462837, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/486853, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/486857, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/486859, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/462513, зареєстрованої 5 червня 1995р., 08/724752, зареєстрованої 2 жовтня 1996р., і 08/759620, зареєстрованої 3 грудня 1996р. Дивися також Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997) і Green and Jakobovits, J Exp. Med. 138: 483-495 (1998). Дивися також Європатент №EP 06 463 151 B1, рішення, опубліковане 12 червня 1996р., заявку на Міжнародний патент №WO 94/02602, опубліковану 3 лютого 1994р., заявку на Міжнародний патент №WO 96/34096, опубліковану 31 жовтня 1996р., і WO 98/24893, опубліковану 11 червня 1998р. Розкриття кожного з цитованих вище патентів, заявок і посилань включені тут як посилання у всій їх повноті.

В альтернативному підході інші, включаючи GenPharm International, Inc., застосовували "мінілокусний" підхід. У мінілокусному підході екзогенний локус Ig мімікрує завдяки включенню шматочків (індивідуальних генів) з локусу Ig. Таким чином, в конструкцію для вставки тварині включають один або більше генів VH, один або більше генів DH, один або більше генів JH, константну область мю і другу константну область (переважно константну область гамма). Цей підхід [описаний в патенті США №5545807, що належить Surani et al., і патентах США №№5545806, 5625825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650 і 5814318, кожний з яких належить Lonberg and Kay, патенті США №5591669, що належить Krimpenfort and Berns, патентах США №№5612205, 5721367, 5789215, що належать Berns et al., і патенті США №5643763, що належить Choi and Dunni, заявках на патент США, що належать GenPharm International з №№07/574748, зареєстрованої 29 серпня 1990р., 07/575962, зареєстрованої 31 серпня 1990р., 07/810279, зареєстрованої 17 грудня 1991р., 07/853408, зареєстрованої 18 березня 1992р., 07/904068, зареєстрованої 23 червня 1992р., 07/990860, зареєстрованої 16 грудня 1992р., 08/053131, зареєстрованої 26 квітня 1993р., 08/096762, зареєстрованої 22 липня 1993р., 08/155301, зареєстрованої 18 листопада 1993р., 08/161739, зареєстрованої 3 грудня 1993р., 08/165699, зареєстрованої 10 грудня 1993р., 08/209741, зареєстрованої 9 березня 1994р., розкриття яких включені тут як посилання. Дивися також європейський патент №0546073 B1, міжнародні патентні заявки №№WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 і WO 98/24884, розкриття яких включені тут як посилання у всій їх повноті. Дивися додатково Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994) і Tuailon et al., (1995), Fishwild et al., (1996)], розкриття яких включені тут як посилання у всій їх повноті.

Винахідники Surani et al., процитовані вище, і представляючи Medical Research Counsel ("MRC"), отримали трансгенну мишу, що містить локус Ig, за допомогою застосування мінілокусного підходу. Винахідники з GenPharm International work, цитовані вище, Lonberg and Kay, слідуючи вказівкам вказаних заявників, запропонували інактивацію ендогенного Ig локусу миші, пов'язаного, по суті, з дублюванням роботи Surani et al.

Перевага мінілокусного підходу полягає в швидкості, з якою можуть бути отримані і введені тварині конструкції, що включають частини локусу Ig. Відповідно, однак, істотний недолік мінілокусного підходу

теоретично полягає в тому, що через включення малих кількостей генів V, D і J вводиться недостатня різноманітність. Дійсно, опублікована робота, мабуть, підтримує це побоювання. Вироблення В-клітин і утворення антитіл тварин, отриманих за допомогою застосування мінілокусного підходу, представляється сумнівним. Отже, дослідження, близьке до даного винаходу, постійно було направлено на введення великих порцій локусу Ig для досягнення більшої різноманітності і для зусиль відтворення імунного репертуару тварин.

Відповіді антимишачого антитіла людини (НАМА.) привели до спроби отримати химерні або гуманізовані іншим образом антитіла. Хоч химерні антитіла містять константну область людини і варіабельну область миші, очікується, що повинні спостерігатися відповіді деякого антихимерного антитіла людини (НАСА), особливо при тривалих або мультидозних застосуваннях антитіла. Таким чином, було б бажаним запропонувати повністю людські антитіла проти CTLA-4 для того, щоб уникнути участі і/або ефектів відповіді НАМА або НАСА.

Гуманізація або дисплейна технологія

Як обговорювалося вище в зв'язку з отриманням антитіл людини, є переваги отримання антитіл зі зниженою імуногенністю. До деякої міри це може бути здійснене в зв'язку зі способами гуманізації і дисплейними методами за допомогою відповідних бібліотек. Потрібно розуміти, що антитіла миші або антитіла інших видів можуть бути наближені до людських або приматних за допомогою способів, добре відомих в даній області. Дивися, [наприклад, Winter and Harris, Immunol Today 14: 43-46 (1993) і Wright et al., Crit.Reviews in Immunol. 12: 125-168 (1992)]. Цікавляче антитіло може бути сконструйоване за допомогою способів рекомбінантної ДНК для заміни CH1, CH2, CH3, шарнірних доменів і/або рамкового домену відповідною послідовністю людини [дивися WO 92/02190 і патенти США №№5530101, 5585089, 5693761, 5693792, 5714350 і 5777085]. У даній області також відоме застосування кДНК Ig для конструювання генів химерних імуноглобулінів [Liu et al., P.N.A.S. 84:3439 (1987) і J. Immunol. 139: 3521 (1987)]. мРНК виділяють з гібридами або інших клітин, що продукують антитіло, і застосовують для отримання кДНК. Цікавляча кДНК може бути ампліфікована полімеразною ланцюговою реакцією із застосуванням специфічних праймерів [пат. США №№4683195 і 4683202]. В іншому варіанті створюють і піддають скринінгу бібліотеку для виділення цікавлячої послідовності.

Послідовність ДНК, що кодує варіабельну область антитіла, потім з'єднують з послідовностями константної області людини. Послідовності генів константних областей людини можуть бути знайдені у Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. publication №91-3242. Гени С-області людини легко доступні з відомих клонів. При виборі ізотипа потрібно керуватися бажаними ефекторними функціями, такими як фіксація комплементу або активність в залежній від антитіла клітинній цитотоксичності. Переважними ізотипами є IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Особливо переважними ізотипами для антитіл винаходу є IgG2 і IgG4. Може бути використана будь-яка з константних областей легкого ланцюга людини капа або лямбда. Химерне гуманізоване антитіло потім експресують традиційними способами.

Фрагменти антитіла, такі як Fv, F (ab')₂ і Fab, можуть бути отримані розщепленням інтактного білка, наприклад, за допомогою протеаз або хімічного розщеплення. В іншому варіанті конструюють укорочений ген. Наприклад, химерний ген, що кодує частину фрагмента F(ab')₂, повинен включати послідовності ДНК, що кодують CH1 домен і шарнірну область ланцюга H, що кінчається стоп-кодоном трансляції для отримання укороченої молекули.

В одному підході консенсусні послідовності, що кодують J області важкого і легкого ланцюгів, можуть бути застосовані для конструювання олігонуклеотидів для застосування в якості праймерів для введення відповідних сайтів рестрикції в J область для подальшого приєднання сегментів V області до сегментів C області людини. кДНК C області може бути модифікована сайт-направленим мутагенезом для вміщення сайту рестрикції в аналогічне положення послідовності людини.

Експресійні вектори включають плазміди, ретровіруси, косміди, YACs, епісоми, похідні від EBV, і тому подібне. Зручним вектором є такий, який кодує функціонально повну послідовність CH або CL імуноглобуліну з відповідними сайтами рестрикції, сконструйованими так, що будь-яка послідовність VH або VL може бути легко вставлена і експресована. У таких векторах звичайно відбувається сплайсінг між донорним сайтом зрощення у вставленій області J і акцепторним сайтом зрощення, попереднім C області людини, а також по областях зрощення, що є в екзонах CH людини. Поліаденілювання і термінація транскрипції відбуваються по природним хромосомним сайтам, розташованим нижче кодуючих областей. Отримане химерне антитіло може бути приєднане до будь-якого сильного промотору, включаючи LTRs ретровірусів, наприклад, ранньому промотору SV-40 [Okayama et al. Mol. Cell. Bio. 3: 280 (1983)], LTR вірусу саркоми, Рауса [German et al., P.N.A.S. 79: 6777 (1982)] і LTR вірусу лейкозу мишей Moloney [Grosschedl et al., Cell. 41: 885 (1985)]; нативні промотори Ig і т.д..

Крім того, антитіла людини або антитіла інших видів можуть бути створені за допомогою технологій дисплейного типу, включаючи, але не обмежуючись цим, фаговий дисплей, ретровірусний дисплей, рибосомний дисплей і інші способи із застосуванням методів, добре відомих в даній області, і отримані молекули можуть бути піддані додатковому дозріванню, такому як афінне дозрівання, оскільки такі способи добре відомі в даній області. [Wright and Harris, вище, Hanes and Plutchau, PNAS USA 94: 4937-4942 (1997)] рибосомний дисплей, [Parmley and Smith, Gene 73: 305-318 (1988)] фаговий дисплей, [Scott, TIBS 17: 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87: 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21: 1081-1085 (1993), Hoganboom et al., Immunol. Reviews 130: 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty, TIBTECH 10: 80-84 і патент США No.5733743]. Якщо дисплейні технології застосовують для отримання антитіл, відмінних від людських, такі антитіла можуть бути гуманізовані як описано вище.

За допомогою цих способів можуть бути отримані антитіла до експресуючих CTLA-4 клітин, самого CTLA-4, формам CTLA-4, його епітопам або пептидам і додатково експресійні бібліотеки [дивися, наприклад, патент США

№5703057], які можуть бути потім піддані скринінгу як описано вище на предмет описаної вище активності.

Додаткові критерії для лікування антитілами

Як повинно бути ясно, звичайно небажано викликати загибель експресуючих CTLA-4 клітин. Навпаки, звичайно бажане просте інгібування скріплення CTLA-4 з його лігандами для зниження негативної регуляції Т-клітин. Один з основних механізмів, за допомогою яких антитіла викликають загибель клітин, є фіксація комплементу і участь в CDC. Константна область антитіла грає важливу роль в зв'язку зі здатністю антитіла до фіксації комплементу і участі в CDC. Таким чином, звичайно вибирають ізотип антитіла, який або забезпечує здібність до фіксації комплементу, або ні. У випадку даного винаходу звичайно, як згадувалося вище, застосування антитіла, що викликає загибель клітин, не є переважним. Існує ряд ізотипів антитіл, здібних до фіксації комплементу і CDC, включаючи, але не обмежуючись цим, наступні: IgM миші, IgG2a миші, IgG2b миші, IgG3 миші, IgM людини, IgG1 людини і IgG3 людини. Ці ізотипи не включають, але не обмежуючись цим, IgG2 людини і IgG4 людини.

Повинно бути ясным, що отримані антитіла не обов'язково повинні початково володіти бажаним ізотипом, а, навпаки, зроблене антитіло може володіти будь-яким ізотипом, і ізотип антитіла може бути перемкнутий пізніше за допомогою традиційних способів, добре відомих в даній області. Такі способи серед інших включають застосування способів прямої рекомбінації [дивися, наприклад, патент США No.4816397], способів злиття клітин (дивися, наприклад, патентну заявку США No.08/730639, зареєстровану 11 жовтня 1996р.).

У способі злиття клітин отримують лінію міеломи або інших клітин, яка містить важкий ланцюг будь-якого бажаного ізотипу, і отримують іншу лінію міеломи або інших клітин, яка містить легкий ланцюг. Такі клітини можуть надалі бути злиті, і може бути виділена клітинна лінія, що експресує інтактне антитіло.

Як приклад більшість антитіл, що обговорюються тут CTLA-4 є IgG2 антитілами проти CTLA-4. Оскільки такі антитіла володіють бажаним скріпленням з молекулою CTLA-4, ізотип будь-якого з таких антитіл може бути легко перемкнутий на вироблення ізотипу IgG4 людини, наприклад, при збереженні тієї ж варіабельної області (яка визначає специфічність антитіла і частину його спорідненості).

Відповідно, як тільки вироблені кандидати антитіла, які відповідають "структурним" характеристикам, як обговорювалося вище, вони звичайно можуть бути забезпечені, щонайменше, певними додатковими "функціональними" характеристиками, які бажані при зміні ізотипу.

Конструювання і створення інших терапевтичних засобів

Відповідно до даного винаходу і засновуючись на активності антитіл, яка тут отримана і охарактеризована у відношенні CTLA-4, полегшується конструювання інших засобів терапевтичного впливу, включаючи інші антитіла, інші антагоністи або хімічні частини, відмінні від антитіл. Такі засоби включають, але не обмежуються цим, антитіла, що мають схожу зв'язуючу активність або функціональність, поліпшені терапевтичні засоби на основі антитіл, такі як біспецифічні антитіла, імунотоксини і радіоактивні терапевтичні засоби, створення пептидних терапевтичних засобів, генна терапія, особливо на рівні організму, антисмислові терапевтичні засоби і малі молекули. Більш того як обговорювалося вище, ефекторна функція антитіл винаходу може бути змінена шляхом перемикання ізотипу на IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE або IgM для різних терапевтичних застосувань.

У зв'язку з створенням поліпшених терапевтичних засобів на основі антитіл, коли бажаною характеристикою є фіксація комплементу, можливо, обійти залежність загибелі клітин від комплементу за допомогою застосування, наприклад, біспецифічних антитіл, імунотоксинів або радіоактивних міток.

У зв'язку з біспецифічними антитілами можуть бути створені біспецифічні антитіла, які включають (i) два антитіла, одне зі специфічністю у відношенні CTLA-4, а інше відносно другої молекули, які сполучені разом, (ii) єдине антитіло, яке має один ланцюг, специфічний у відношенні CTLA-4, і другий ланцюг, специфічний відносно другої молекули, або (iii) одноланцюгове антитіло, що володіє специфічністю у відношенні CTLA-4 і іншої молекули. Такі біспецифічні антитіла можуть бути створені при застосуванні способів, які добре відомі, наприклад, в зв'язку з (i) і (ii) дивися, [наприклад, Fanger et al., Immunol. Methods 4: 72-81 (1994) і Wright and Harris], вище, і зв'язки з (iii) дивися, [наприклад, Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52 (1992)].

Додатково можуть бути також отримані "капатіла" [Ill et al., "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" Protein Eng 10: 949-57 (1997)], "мінітіла" [Martin et al., "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" EMBO J 13: 5303-9 (1994)], "діатіла" [Holliger et al., "Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)] або "янусини" [Traunecker et al., "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10: 3655-3659 (1991) і Traunecker et al., "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52(1992)].

У відношенні імунотоксинів, антитіла можуть бути модифіковані до вияву активності імунотоксинів із застосуванням способів, добре відомих в цій області. Дивися, [наприклад, патент США No.5194594]. Відносно отримання радіоактивних антитіл, такі модифіковані антитіла можуть бути також легко отримані із застосуванням способів, добре відомих в цій області. Дивися, [наприклад, Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy, 655-686, 2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)]. Дивися також [патенти США №№4681581, 4735210, 5101827, 5102990 (RE35500), 5648471 і 5697902]. Кожний з імунотоксинів і радіоактивних молекул повинен бути відповідним для знищення клітин, експресуючих CTLA-4, і особливо тих клітин, в яких антитіла даного винаходу є ефективними.

Відносно створення терапевтичних пептидів, терапевтичні пептиди, які направлені проти CTLA-4, можуть бути створені шляхом використання інформації про структуру CTLA-4 і антитіл до нього, такої як антитіла

даного винаходу (як обговорюється нижче відносно малих молекул), або скринінгу пептидних бібліотек. Конструювання і скринінг пептидних терапевтичних засобів обговорюється в зв'язку з роботою [Houghten et al., Biotechniques 13: 412-421 (1992), Houghten PNAS USA 82: 5131-5135 (1985), Pinalla et al, Biotechniques 13: 901-905 (1992), Blake and Litz-Davis BioConjugate Chem. 3: 510-513 (1992)]. Імунотоксини і радіоактивні молекули можуть бути також отримані схожим образом і з пептидними частинами, як обговорювалося вище відносно антитіл.

Важлива інформація відносно скріплення антитіла з антигеном може бути отримана в експериментах з фаговим дисплеєм. Такі експерименти звичайно виконуються шляхом перегляду бібліотеки фагів, експресуючих випадкові пептиди, на скріплення їх з антитілами винаходу для визначення того, чи можуть бути виділені пептиди, які з ними зв'язуються. У разі успішного результату може бути отримана певна інформація про епітопи пептидів, які зв'язуються.

Загалом, бібліотеки фагів, експресуючі випадкові пептиди, можуть бути придбані від New England Biolabs (7-mer and 12-mer libraries, Ph.D.-7 Peptide 7-mer Library Kit і Ph.D.-12 Peptide 12-mer Library Kit, відповідно) на основі системи M13 бактеріофага. 7-мер бібліотека являє собою множину з приблизно $2,0 \times 10^9$ незалежних кланів, які представляють більшість, якщо не всі, з $20^7 = 1,28 \times 10^9$ можливих 7-мер послідовностей. 12-мер бібліотека містить приблизно $1,9 \times 10^9$ незалежних клонів і представляє тільки дуже небагато зразків потенційного простору послідовностей $20^{12} = 4,1 \times 10^{15}$ 12-мер послідовностей. Кожну з 7-мер і 12-мер бібліотек переглядають або проводять скринінг відповідно до рекомендацій виробника, при якому планшети покривали антитілом для скріплення з відповідним антитілом (наприклад, Fc IgG кози проти білків людини для антитіл IgG) з подальшим промиванням. Пов'язаний фаг елюють 0,2М гліцином-HCl, pH2,2. Після 3 циклів селекції/ампліфікації при постійних умовах (0,5% Твін) за допомогою секвенування ДНК можна охарактеризувати клони з бібліотек, які взаємодіють з одним або більш антитілами. Реакційну здатність пептидів можна визначити з допомогою ELIS A. Для додаткового обговорення епітопного аналізу пептидів [дивися також Scott, J.K. and Smith, Science, 249: 386-390 (1990); Cwirla et al., PNAS USA 87: 6378-6382 (1990); Felici et al., J. Mol. Biol. 222: 301-310 (1991), і Kuwabara et al., Nature Biotechnology 15: 74-78 (1997)].

Реалізація генної і/або антисмислової терапії за допомогою традиційних способів також полегшується внаслідок даного винаходу. Такі засоби можуть бути використані для модуляції функцій CTLA-4. У зв'язку з цим антитіла даного винаходу сприяють розробці і застосуванню пов'язаних з ними функціональних тестів. Розробка і стратегія антисмислової терапії детально обговорюється [в міжнародній патентній заявці NoWO 94/29444]. Розробка і стратегія генної терапії добре відомі. Однак, зокрема, застосування способів генної терапії з використанням антитіл повинно виявитися особливо вигідним. Дивися, [наприклад, Chen et al., Human Gene Therapy 5: 595-601 (1994) і Marasco Gene Therapy 4: 11-15 (1997)]. Загальний задум і обговорення, що відноситься до генної терапії, обговорюються також [в міжнародній патентній заявці No.WO 97/38137]. Генетичний матеріал, що кодує антитіло даного винаходу (такий як 4.1.1, 4.8.1 або 6.1.1 або інший), може бути включений у відповідну експресійну систему (або вірусну, або ослаблену вірусну, невірусну, безоболонкову або іншу) і введений господареві для вироблення антитіл у господаря in vivo.

Відповідно до даного винаходу можна також представити терапію із застосуванням малих молекул. На основі даного винаходу можуть бути розроблені ліки для модуляції активності CTLA-4. Знання, отримані при вивченні структури молекули CTLA-4 і її взаємодій з іншими молекулами відповідно до даного винаходу, такими як антитіла винаходу, CD28, B7, B7-1, B7-2 і іншими, можуть бути використані для раціонального планування додаткових терапевтичних впливів. У цьому відношенні для концентрування зусиль на відкритті ліків може бути застосовані раціональні способи розробки ліків, такі як рентгеноструктурна кристалографія, молекулярне моделювання за допомогою (або при підтримці) комп'ютера (CAMM), якісний або кількісний структурно-функціональний взаємозв'язок (QSAR) і схожі способи. Раціональна розробка дозволяє передбачити білкові або синтетичні структури, які можуть взаємодіяти з молекулою або її специфічними формами, які можуть бути використані для модифікації або модуляції активності CTLA-4. Такі структури можуть бути синтезовані хімічно або експресовані в біологічних системах. Огляд цього підходу зроблений у Capsey et al., Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)). Дійсно, раціональне конструювання молекул (або пептидів, пептидоміметиків, малих молекул, або аналогічних), засноване на відомих або описаних структурно-функціональних взаємозв'язках з іншими молекулами (такими, як антитіла відповідно до даного винаходу), взагалі стає рутинним. Дивися, [наприклад, Fry et al., "Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor" Proc Natl Acad Sci USA 95: 12022-7 (1998); Hoffman et al., "A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain" J. Mol. Biol. 282: 195-208 (1998); Ginalski et al., "Modelling of active forms of protein kinases: p38 -- a case study", Ada Biochim. Pol. 44: 557-64 (1997); Jouko et al., "Identification of csk tyrosine phosphorylation sites and a tyrosine residue important for kinase domain structure", Biochem. J. 322: 927-35 (1997); Singh et al., "Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor superfamily of protein tyrosine kinases" J. Med. Chem. 40: 1130-5 (1997); Mandel et al., "ABGEN: a knowledge-based automated approach for antibody structure modeling" Nat. Biotechnol. 14: 323-8 (1996); Monfardini et al., "Rational design, analysis, and potential utility of GM-CSF antagonists" Proc. Assoc. Am. Physicians, 108: 420-31 (1996); Furet et al., "Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411", J. Comput. Aided. Mol. Des. 9: 465-72 (1995)].

Далі, можуть бути створені і синтезовані комбінаторні бібліотеки, і вони можуть бути використані в

програмах скринінгу, таких як досягнення скринінгу з високим виходом.

Терапевтичні складки і введення

Повинно бути зрозуміло, що введення терапевтичної основи відповідно до даного винаходу повинно бути проведене з відповідними носіями, наповнювачами і іншими агентами, які включають в складки для забезпечення поліпшеного перенесення, доставки, толерантності і тому подібне. Може бути знайдена множина відповідних складів в керівництві, відомому всім хімікам-фармацевтам: [Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), особливо в розділі 87, написаному Blaug, Seymour]. Ці складки включають, наприклад, порошки, пасти, мазі, желе, віск, масла, ліпіди, що містять ліпіди (катионні або аніонні) везикули (такі як Lipofectin™), кон'югати з ДНК, безводні абсорбуючі пасти, масляно-водні і водно-масляні емульсії, емульгований карбовакс (поліетиленгліколи різної молекулярної ваги), напівтверді гелі і напівтверді суміші, що містять карбовакс. Для лікування і терапії відповідно до даного винаходу може підходити будь-яка з перерахованих вище сумішей, що пропонується так, щоб активний інгредієнт в складі не інактивувався складом і склад був фізіологічно сумісним і підходив до способу введення. Дивися також [Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA J. Pharm. Sci. Technol. 52: 238-311 (1998)] і цитовані там посилання для додаткової інформації, що відноситься до наповнювачів і носіїв, добре відомих хімікам-фармацевтам.

Отримання антитіл

Антитіла відповідно до даного винаходу переважно отримують шляхом використання трансгенної миші, яка має істотну частку вбудованого геному, що продукує антитіла людини, але яка за рахунок цього дефіцитна відносно продукції ендогенних мишачих антитіл. Такі миші потім здатні продукувати молекули імуноглобулінів людини і антитіла, а також мають дефіцит продукції молекул імуноглобулінів і антитіла миші. Технології, що застосовуються для досягнення цієї мети, розкриті в патентах, заявках і посиланнях, розкритих тут у відомому рівні техніки. Особливо, однак, переважне здійснення отримання трансгенних мишей і продукції ними антитіл розкрито [в патентній заявці США No.08/759620, зареєстрованої 3 грудня 1996р.], розкриття якої включене тут як посилання. Дивися також [Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997)], розкриття якої включене тут як посилання.

За допомогою застосування такої технології заявники отримали повністю людські моноклональні антитіла до множини антигенів. Істотно, що заявники імунізували лінії XenoMouse™ мишей цікавлячим антигеном, витягували у мишей, які експресують антитіла лімфатичні клітини (такі як В-клітини), гібридизували такі витягнуті клітини з клітинною лінією мієлоїдного типу для отримання іморталізованих гібридомних клітинних ліній і проводили скринінг і відбір таких гібридомних клітинних ліній для ідентифікації гібридомних клітинних ліній, які продукують антитіла, специфічні відносно цікавлячого антигена. Заявники застосовували такі технології відповідно до даного винаходу для отримання антитіл, специфічних у відношенні CTLA-4. Тут заявники описують отримання множини гібридомних клітинних ліній, які продукують антитіла, специфічні у відношенні CTLA-4. Крім того, заявники представляють характеристику антитіл, що продукуються такими клітинними лініями, включаючи аналізи нуклеотидної і амінокислотної послідовностей важкого і легкого ланцюгів таких антитіл.

Антитіла, що продукуються гібридомними, клітинними лініями, що обговорюються тут, позначені як 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1. Кожне з антитіл, що продукується вказаними вище клітинними лініями, містить повністю людські IgG2 або IgG4 важкі ланцюги з людськими легкими капа ланцюгами. Загалом, антитіла відповідно до даного винаходу володіють дуже високою спорідненістю, володіючи звичайно Kd від приблизно 10⁻⁹ до приблизно 10⁻¹¹M при вимірюванні або за допомогою твердої фази, або рідкої фази.

Як повинне бути зрозуміло, антитіла відповідно до даного винаходу можуть експресуватися в клітинних лініях, відрізняючись від гібридомних клітинних ліній. Послідовності, що кодують ДНК або геномні клони для конкретних антитіл, можуть бути використані для трансформації відповідних клітин господаря-савця або нессавця. Трансформація може бути проведена за допомогою будь-якого відомого способу введення полінуклеотидів в клітину господаря, включаючи, наприклад, введення полінуклеотида у вірус (або у вірусний вектор) і проведення трансдукції клітини господаря вірусом (або вектором) або за допомогою процедур трансфекції, відомих в даній області, приклади чого приводяться [в патентах США №№4399216, 4912040, 4740461 і 4959455] (дані патенти включені тут як посилання). Процедура трансформації, що застосовується залежить від господаря, що піддається трансформації. Способи введення гетерологічних полінуклеотидів в клітини ссавців добре відомі в даній області і включають, але не обмежуються цим, трансфекцію, що опосередковується декстраном, осадження фосфатом кальцію, трансфекцію, що опосередковується полібреном, злиття протопластів, електропорацію, бомбардування частками, інкапсулювання полінуклеотида(ів) в ліпосоми, кон'югування пептидів, використання дендримерів і безпосередню мікроін'єкцію ДНК в ядра.

Клітинні лінії ссавців, придатні як господарі для експресії, добре відомі в даній області і включають багато які іморталізовані клітинні лінії, що поставляються American Type Culture Collection (ATCC), включаючи, але не обмежуючись цим, клітини яєчників китайського хом'яка (CHO), NSO₀, клітини HeLa, клітини нирок діток хом'яка (ВНК), клітини нирок мавпи (COS), клітини гепатоцелюлярної карциноми людини (наприклад, Нер G2) і велику кількість інших клітинних ліній. Для експресії рекомбінантних антитіл можуть також використовуватися клітини нессавців, включаючи, але не обмежуючись цим, бактерій, дріжджів, комах і рослин. Сайт-спрямований мутагенез CP2 домену антитіла для усунення глікозилювання може бути переважним для того, щоб запобігти змінам або в імуногенності, фармакокінетиці і/або ефекторних функціях, виникаючих внаслідок глікозилювання, не властивого людським антитілам. Експресійні способи вибирають шляхом

визначення того, яка система дає найбільш високі рівні експресії і продукує антитіла з конститутивними зв'язуючими властивостями CTLA-4.

Крім того, експресія антитіл даного винаходу (або інших їх частин) клітинними лініями, що їх продукують, може бути збільшена за допомогою застосування великого числа відомих способів. Наприклад, системи експресії генів глутамінсинтетази і DHFR є звичайними для збільшення експресії в певних умовах. Клітинні клони з високим рівнем експресії можуть бути ідентифіковані із застосуванням традиційних способів, таких як клонування з обмеженим розведенням і технологія Microdrop. Система DS обговорюється частково або повністю в зв'язку [з європейськими патентами №№0217846, 0256055 і 0323997 і європейською патентною заявкою №.89303964.4].

Антитіла даного винаходу можуть також продукуватися трансгенно за допомогою створення ссавця або рослини, яка є трансгенною відносно цікавлячих послідовностей важкого і легкого ланцюгів імуноглобуліну і продукує антитіло в формі, що витягується з нього. Відносно трансгенної продукції у ссавців, у них можуть продукуватися антитіла і виявлятися в молоці кіз, корів або інших ссавців. Дивися, [наприклад, патенти США №№5827690, 5756687, 5750172 і 5741957].

Антитіла відповідно до даного винаходу проаналізовані структурно і функціонально. Відносно структури антитіл, амінокислотні послідовності важкого і легкого капа ланцюгів передбачені на основі послідовностей ДНК, отриманих з допомогою ОТ-ПЛР гібридом. Дивися приклади 3 і 4 і Фіг.1-8. для підтвердження результатів, що обговорюються в прикладах 3 і 4, було також проведено секвенування N-кінців антитіл. Дивися приклад 5 і фігуру 9. Для визначення спорідненості проводили кінетичний аналіз антитіл. Дивися приклад 2. Антитіла відповідно до даного винаходу (і особливо 4.1.1, 4.8.1 і 6.1.1 антитіла винаходу) мають високу спорідненість ($4.1.1:1,63 \times 10^{10}$ 1/М; $4.8.1:3,54 \times 10^{10}$ 1/М; і $6.1.1:7,2 \times 10^9$ 1/М). Крім того, антитіла аналізували за допомогою ізоелектричного фокусування (IEF), електрофорезу (ДДС-ПАГЕ) у відновлюючих умовах, ексклюзійної хроматографії, рідинної хроматографії/мас-спектроскопії і мас-спектроскопії і визначали продукцію антитіл гібридомами. Дивися приклад 6 і Фіг.10.

Відносно функціонального аналізу антитіл відповідно до даного винаходу, такі антитіла, що пропонуються є сильними інгібіторами CTLA-4 і їх скріплення зі своїми лігандами - молекулами сімейства B7. Наприклад, антитіла відповідно до даного винаходу, як показано, блокують скріплення CTLA-4 або з B7-1, або з B7-2. Дивися приклад 7. Зрозуміло, багато які з антитіл відповідно до даного винаходу володіють наномолярною або субнаномолярною IC_{50} відносно гальмування скріплення CTLA-4 з B7-1 і B7-2. Крім того, антитіла даного винаходу володіють прекрасною вибірковістю у відношенні CTLA-4 в порівнянні з CD28, CD44, B7-2 або hlgG1. Дивися приклад 8. Вибірковість являє собою відношення, яке відображає міру переважного скріплення молекули з першим агентом в порівнянні зі скріпленням молекули з другим і необов'язково іншими молекулами. Тут вибірковість означає міру переважного скріплення антитіла винаходу з CTLA-4 в порівнянні зі скріпленням антитіла з іншими молекулами, такими як CD28, CD44, B7-2 або hlgG1. Рівень вибіркової антитіл винаходу звичайно вище, ніж 500:1. Антитіла даного винаходу, як також було показано, індують або збільшують експресію певних цитокінів (таких як IL-2 і IFN- γ) при культивуванні Т-клітин в моделі Т-лімфобластів. Дивися приклади 9 і 10 і Фіг.12-17. Більш того очікується, що антитіла винаходу будуть гальмувати зростання пухлин у відповідних моделях пухлин in vitro. Створення таких моделей обговорюється в прикладі 11 і 12.

Результати, отримані відповідно до даного винаходу, вказують на те, що антитіла даного винаходу володіють певними достоїнствами, що може зробити дані антитіла більш ефективними, ніж терапевтичні антитіла, що є в цей час проти CTLA-4.

Зокрема, антитіла винаходу 4.1.1, 4.8.1 і 6.1.1 володіють бажаними властивостями у високій мірі. їх структурні характеристики, функції або активність є критеріями, які сприяють створенню або відбору додаткових антитіл або інших молекул, як обговорювалося вище. Такі критерії включають один або більш з наступного:

Здатність конкурувати за скріплення з CTLA-4 з одним або більш антитіл винаходу; Специфічність скріплення з CTLA-4, схожа з одним або більше антитіл винаходу; Зв'язуюча спорідненість у відношенні CTLA-4 приблизно 10^{-9} М або більш і переважно 10^{-10} М або більш;

Відсутність перехресної реакції з CTLA-4 нижчих ссавців, включаючи переважно мишу, пацюка або кролика і переважно CTLA-4 миші;

Наявність перехресної реакції з CTLA-4 приматів, включаючи переважно CTLA-4 довгохвостих макак і макак резус;

Вибірковість у відношенні CTLA-4 в порівнянні з CD28, B7-2, CD44 або hlgG1, щонайменше, біля 100:1 або більш і переважно приблизно 300, 400 або 500:1 або більше; IC_{50} при гальмуванні скріплення CTLA-4 з B7-2 приблизно 100нМ або нижче і переважно 5, 4, 3,2, 1, 0,5 або 0,38нМ або менше;

IC_{50} при гальмуванні скріплення CTLA-4 з B7-1 приблизно 100нМ або нижче і переважно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 або 0,50нМ або менше;

Збільшення продукції цитокінів в одному або більше тестів in vitro, наприклад:

Збільшення продукції IL-2 в тесті Т-лімфобластів/Raji на приблизно 500пг/мл або вище і переважно на 750, 1000, 1500, 2000, 3000 або 3846пг/мл або більше;

Збільшення продукції IFN- γ в тесті Т-лімфобластів/Raji на приблизно 500пг/мл або більше і переважно на 750, 1000 або 1233пг/мл або більше;

або

Збільшення продукції IL-2 в тесті суперантигену в hPBMC або суцільній крові на приблизно 500пг/мл або більше і переважно на 750, 1000, 1200 або 1511пг/мл або більше. При іншому вираженні величин бажано, щоб продукція IL-2 збільшувалася на приблизно 30, 35, 40,45, 50 процентів або більше по відношенню до контролю

тесту.

Очікується, що антитіла (або молекули, сконструйовані або синтезовані на їх основі), що мають одну або більше з даних властивостей, повинні володіти ефективністю, схожою з антитілами, описаними в даному винаході.

Бажані функціональні властивості, що обговорюються вище часто можуть бути результатом скріплення молекули (тобто антитіла, фрагмента антитіла, пептиду або малої молекули) з CTLA-4 і гальмуванням його активності схожим чином, що і антитіло даного винаходу (тобто скріплення з тим же або схожим епітопом молекули CTLA-4). Молекулу можна вводити або прямо (тобто пряме введення хворому таких молекул). Або, в протилежному варіанті, молекулу можна вводити "посередньо" (тобто пептид або подібна йому сполука, яка викликає імунну відповідь у хворого (схожий з вакциною), де імунна відповідь включає вироблення антитіл, які взаємодіють з тим же самим або схожим епітопом, або антитіло або фрагмент, які продукуються *in situ* після введення генетичних матеріалів, які кодують такі антитіла або їх фрагменти, які взаємодіють з тим же самим або схожим епітопом). Таким чином, повинне бути зрозуміло, що епітоп CTLA-4, з яким взаємодіють антитіла винаходу, може бути корисний в зв'язку з отриманням і/або схемою терапії відповідно до даного винаходу. При створенні ліків часто корисна також негативна інформація (тобто корисний той факт, що антитіло, яке взаємодіє з CTLA-4, ймовірно, не взаємодіє з епітопом, який діє як інгібітор CTLA-4). Таким чином, епітоп, з яким взаємодіють антитіла винаходу, що не веде до бажаних функціональних властивостей, може бути також дуже корисний. Отже, відповідно до даного винаходу розглядаються також молекули (і особливо антитіла), які взаємодіють з тими ж самими або схожими епітопами, що і антитіла винаходу.

У доповнення до того факту, що антитіла винаходу і епітопи, з якими вони взаємодіють, розглядаються відповідно до даного винаходу, заявники провели деяку попередню роботу з картирування епітопів певних антитіл відповідно до даного винаходу і особливо антитіл 4.1.1 і 11.2.1 винаходу.

Як перший етап заявники провели конкурентний аналіз BIOcore для створення чорнової карти скріплення певними антитілами винаходу по їх здатності конкурувати за скріплення з CTLA-4. З цією метою CTLA-4 був пов'язаний з чіпом BIOcore і перше антитіло взаємодіяло з ним в насичуючих умовах, і вимірювали конкуренцію подальших других антитіл за скріплення з CTLA-4. Цей спосіб дає можливість створити чорнову карту, по якій можуть бути класифіковані сімейства антитіл.

За допомогою цього способу заявники виявили, що певні антитіла відповідно до даного винаходу можуть бути поділені на категорії, попадаючи в одну з перерахованих нижче категорій:

Категорія	Антитіла	Конкуренція за скріплення з CTLA-4
A	B01M*	Вільна перехресна конкуренція одного з другим; перехресна конкуренція з категорією B; деякий ступінь перехресної конкуренції з категорією D
	B02M**	
B	4.1.1	Вільна перехресна конкуренція одного з другим; перехресна конкуренція з категорією A, C і D.
	4.13.1	
C	6.1.1	Вільна перехресна конкуренція одного з другим; перехресна конкуренція з категорією B і категорією D
	3.1.1	
	4.8.1	
	11.2.1	
	11.6.1	
	11.7.1	
D	4.14.3	Перехресна конкуренція з категорією CIB; деякий ступінь перехресної конкуренції з категорією A
E	4.9.1	BNI3 блокує скріплення 4.9.1 з CTLA-4, але не навпаки
	BNI3***	
(*) (**) отримані від Biostride. (***) отримані від Pharmingen.		

На наступному етапі заявники спробували визначити чи впізнають антитіла винаходу лінійний епітоп на CTLA4 при поновлюючих і непоновлюючих умовах при імуноблотінгу. Заявники виявили, що жодне з антитіл винаходу 4.1.1, 3.1.1, 11.7.1, 11.6.1 або 11.2.1, мабуть, не впізнає відновлену форму CTLA4 при імуноблотінгу. Отже, схоже, що епітоп, з яким кожне з цих антитіл зв'язується, не є лінійним епітопом, а швидше є конформаційним епітопом зі структурою, яка руйнується при поновлюючих умовах.

Таким чином, заявники вирішили визначити, що можна дізнатися про залишки в молекулі CTLA4, які важливі для скріплення антитіл винаходу. Один з способів, використаних заявниками, полягав в проведенні кінетичних визначень зворотних швидкостей при порівнянні CTLA4 людини з двома висококонсервативними молекулами CTLA4 приматів (CTLA4 довгохвостих макак і мавп). Дослідження з допомогою BIAcore показало, що антитіло 4.1.1 винаходу зв'язується з CTLA4 людини, довгохвостих мавп і мавп з однаковою швидкістю. Однак, відносно зворотних швидкостей (спорідненість) антитіло 4.1.1 володіло найбільшою спорідненістю (найбільш повільною зворотною швидкістю) відносно CTLA4 людини, більш високою зворотною швидкістю відносно CTLA4 довгохвості мавпи і найбільш високою зворотною швидкістю відносно CTLA4 мавпи. Антитіло 11.2.1 винаходу, з іншого боку, зв'язується з CTLA4 людини, довгохвостих мавп і мавп з приблизно однаковою швидкістю і володіє приблизно однаковою відносною зворотною швидкістю для кожного з трьох CTLA4. Ця інформація додатково вказує на те, що антитіла винаходу 4.1.1 і 11.2.1 зв'язуються з різними епітопами CTLA4.

Для подальшого вивчення епітопа, з яким зв'язуються антитіла винаходу категорії B і C, заявники провели

певне дослідження по сайт-направленому мутагенезу. У CTLA4 мавпи міститься дві важливих заміни в залишках 105 і 106 по відношенню CTLA4 людини. Такими відмінностями є заміна лейцину на метіонін в положенні 105 і гліцину на серин в положенні 106. Відповідно, заявники створювали мутацію кДНК, що кодує CTLA4 людини, що кодує мутантний CTLA4, із заміною L105M і G106S. Гомологічна заміна в мутантному CTLA4 не впливала на скріплення гібридного білка B7.2-IgG1. Крім того, скріплення з антитілом винаходу 11.2.1 не змінювалося. Однак здатність такої молекули зв'язуватися з антитілом винаходу 4.1.1 (схоже з мавпами) значно гальмувалася. Далі, заявники викликали мутацію кДНК, що кодує CTLA4 мавпи, для створення мутантного CTLA4 мавпи, що містить заміну S106G. Така заміна приводила до відновлення стабільного скріплення антитіла 4.1.1 і мутантного CTLA4 мавпи. Крім того, заявники викликали мутацію кДНК, що кодує CTLA4 мавпи, для створення мутантного CTLA4 мавпи, що містить заміну M105L. Така заміна частково відновлювала скріплення антитіла 4.1.1 з мутантним CTLA4.

Кожна з категорій від В до D антитіл винаходу, мабуть, володіє схожими функціональними властивостями і, очевидно, має можливість діяти як сильний терапевтичний агент, направлений проти CTLA4. Більш того кожна з молекул характеризується певною перехресною конкуренцією при скріпленні з CTLA4. Однак, як повинне бути ясно з представленого вище обговорення, кожна з молекул різних категорій, очевидно, взаємодіє з окремими конформаційними епітопами CTLA4.

З викладеного вище повинне бути зрозуміло, що інформація про епітопи, що обговорюється вище, вказує на те, що антитіла (або інші молекули, як обговорювалося вище), які перехресно конкурують з антитілами винаходу, повинні, ймовірно, мати певний терапевтичний потенціал відповідно до даного винаходу. Більш того очікується, що антитіла (або інші молекули, як обговорювалося вище), які перехресно конкурують з антитілами винаходу (тобто перехресно конкурують з категорією В, С і/або D антитіл), повинні, ймовірно, мати певний додатковий терапевтичний потенціал відповідно до даного винаходу. Крім того, очікується, що антитіла (або інші молекули, як обговорювалося вище), які перехресно конкурують з антитілами винаходу (тобто перехресно конкурують з категорією В, С і/або D антитіл) і які (i) не характеризуються зниженням скріпленням з CTLA4 мавп (подібно антитілу 11.2.1) або (ii) характеризуються зниженням скріпленням з CTLA4 мавп (подібно антитілу 4.1.1), повинні, ймовірно, мати певний додатковий терапевтичний потенціал відповідно до даного винаходу. Антитіла (або інші молекули, як обговорювалося вище), які конкурують з категоріями А і Е можуть також мати певний терапевтичний потенціал.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади, включаючи проведені експерименти і досягнуті результати, пропонуються лише для цілей ілюстрації і їх не треба тлумачити як такі, що обмежують даній винахід.

Приклад 1

Створення гібридом, що продукують антитіла проти CTLA-4

Антитіла винаходу отримували, відбирали і аналізували відповідно до даного прикладу.

Отримання антигена: Для імунізації мишей XenoMouse™ отримували три різних імуногени: (i) гібридний білок CTLA-4-IgG, (ii) пептид CTLA-4 і (iii) лімфомні клітини 300.19 миші, трансфіковані мутантним CTLA-4 (Y201V), який конститутивно експресувався на клітинній поверхні. (i) гібридний білок CTLA-4-IgG: Конструювання експресійного вектора:

кДНК, що кодує зрілий позаклітинний домен CTLA-4, ампліфіювали за допомогою ПЛР з бібліотеки кДНК тимусу (Clontech) із застосуванням праймерів, розроблених відповідно до опублікованої послідовності [Eur. J. Immunol. 18: 1901-1905 (1988)]. Фрагмент направлено субклонували в pSR5, експресійну плазмиду вірусу Sindbis (InVitrogen), з локалізацією між сигнальним пептидом онкостатину М людини і доменами CH1/CH2/CH3 IgG gamma 1 (IgG1) людини. Гібридний білок не містить шарнірного домену, але містить цистеїн-120 у позаклітинному домені CTLA-4 для утворення ковалентного димеру. Отриманий вектор був названий CTLA-4-IgG1/pSR5. Цілісність кДНК CTLA-4-IgG1 у векторі була підтверджена секвенуванням обох ланцюгів. Амінокислотна послідовність білка CTLA-4-Ig показана нижче. Зрілий позаклітинний домен для CD44 ампліфікували за допомогою ПЛР з бібліотеки лімфоцитів людини (Clontech) і субклонували в pSinRep5 для отримання контрольного білка з ідентичною IgG1-кінцевою частиною.

OM-CTLA4-IgG1 гібридний білок:

MCVLLTORTLLSLYLALLPSSMASMAMHVAQFAYVLASSRGCIASSTVC
EYASPCGKATEVRYTYLROADSOYTEVCAATYMMGNELTELDDSICT
CTSSGNOYNLHQCIRAMPTOLYICKVELMYPPPTYYLGIGNGTQY
VIDPFETCPDSNLEGAPSVLEFPKPKDTLMISRITPEVTCVYVDVSHEDPE
YKFNWYVDGYFVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTIVLHODWLNQKE
YKCKYSNKAALPTPEKTISKAKGQPREPOVYITLPSSDELTKNQVSLTCL
VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFELYSKLTIVOKSR
WQCGNYVSCSVMTALEAHNYTQKSLSLSPGK

Підкреслено: сигнальний пептид Жирний шрифт: позаклітинний домен CTLA4 кДНК зрілого позаклітинного домену CD28 ампліфікували за допомогою ПЛР з бібліотеки лімфоцитів людини (Clontech) і потім субклонували в рCDM8 [J. Immunol. 151: 5261-71 (1993)] для отримання гібридного білка IgG1, що містить область розщеплення тромбіном і шарнірну область. CTLA4 мавпи, довгохвості макаки і макаки-резус клонували, виходячи з мРНК, виділеної з РНА, стимульованих РВМС із застосуванням стандартних способів ПЛР з виродженими праймерами. Секвенування показало, що амінокислотна послідовність у макаки-резус і довгохвості макаки ідентична зрілому позаклітинному домену CTLA4 людини з трьома замінами (S13N, I17T і L105M), У мавпи виявлено десять амінокислотних замін в порівнянні зі зрілим позаклітинним доменом CTLA4 людини (V21A, V33I, A41T, A51G, 541, S71F, Q75K, T88M, L105M і G106S). Для картирування амінокислот, важливих для взаємодії антитіл з CTLA4-IgG людини застосовували сайт-направлений мутагенез для створення крапкових мутацій всіх амінокислот, відмінних у CTLA4 мавпи. Мутації CTLA-IgG людини і мавпи для епітопного картирування проводили шляхом встановлення відповідності сайт-направленого мутагенезу (Promega). Гібридні білки IgG отримували імпульсною трансфекцією клітин Cos7 і очищали за допомогою стандартних способів із застосуванням протешу А. Мутантні білки CTLA4-IgG оцінювали по скріпленню з антитілами за допомогою імуноблотінгу і із застосуванням аналізів BIAcore.

Експресія/очищення рекомбінантного білка

Рекомбінантний вірус синдбіс отримували електропорацією (Gibco) клітин нирок новонароджених хом'яків з SP6 транскрибуванням in vitro мРНК CTLA-4-IgG1/pSR5 і хелперної мРНК DH26S як описано в інструкції In Vitrogen. Через сорок вісім годин вірус збирали і титрували на оптимальну експресію білка в клітинах яєчників китайського хом'яка (CHO-K1). Клітини CHO-K1 культивували в суспензії в середовищі DMEM/F12 (модифікованого за Дульбекко середовища Ігла), утримуючому 10% термо-інактивованої телячої плідної сироватки (Gibco), замінили амінокислоти (Gibco), 4мм glutамін (Gibco), пеніцилін/стрептоміцин (Gibco), 10мМ Нерес pH ,5 (Gibco). Для отримання CTLA-4-IgG1 клітини CHO-K1 ресуспендували в концентрації 1×10^7 клітин/мл в середовищі DMEM/F12 і інкубували з вірусом синдбіс протягом однієї години при кімнатній температурі. Клітини потім розводили до 1×10^6 /мл середовищем DMEM/F12, що містить 1% телячої плідної сироватки, виснажену відносно IgG корови за допомогою протеїн А сефарози (Pharmacia), замінили амінокислоти, 4мМ glutамін, 12,5мМ Нерес pH7,5 і пеніцилін/стрептоміцин. Через сорок вісім годин після ін'єкції клітини осаджували, збирали кондиціоноване середовище, додавали таблетки повного протеазного інгібітору (Boehringer Mannheim), доводили pH до 7,5 і фільтрували через фільтр 0,2мкм (Nalgene). Для афінного очищення гібридного білка використали FPLC (рідинну хроматографію швидкого розрізнення) (Pharmacia) з швидкістю струму 10мл/міна. Колонку промивали 30 об'ємами 3ФР і елюювали 0,1М гліцин/HCl pH2,8 з швидкістю 1мл/хв. Фракції (1мл) негайно нейтралізували до pH7,5 за допомогою Tris, pH9. Фракції, що містять CTLA-4-IgG1 ідентифікували з допомогою ДДС-ПАГЕ і потім концентрували із застосуванням Centrplus 50 (Amicon) перед нанесенням на колонку сефарози 200 (Pharmacia) з швидкістю 1мл/хв. з використанням як розчинника 3ФР. Утримуючі CTLA-4-IgG1 фракції об'єднували, стерилізували фільтруванням через фільтр 0,2мкм (Millipore), ділили на аліквоти і заморожували при -80°C. CD44-IgG1 експресували і очищали із застосуванням тих же способів. CD28-IgG очищали з кондиціонованого середовища від клітин Cos7, підданих імпульсній трансфекції.

Характеристика CTLA-4-IgG1:

Очищений CTLA-4-IgG1 рухався у вигляді єдиної смуги при електрофорезі в ДДС-Na-ПАГ при використанні для фарбування колоїдного кумасі (Novex). У невідновлюючих умовах CTLA-4-IgG1 знаходився в формі димеру (100кДа), який відновлювався до мономера 50кДа після обробки 50мМ DTT (дитіотреїтолу). Амінокислотне секвенування очищеного CTLA-4-IgG1 в розчині підтвердило наявність N-кінця CTLA-4 (MHVAQPAVVLAS), а також відщеплення сигнального пептиду онкостатину М від зрілого гібридного білка. CTLA-4-IgG1 зв'язувався з імобілізованим B7.1-IgG в залежності від концентрації і скріплення блокувалося антитілом хом'яка проти CTLA-4 людини (BN13: PharMingen). Стерильний CTLA-4-IgG1 не містив ендотоксину і його кількісно визначали за ОП280 із застосуванням коефіцієнта екстинкції 1,4. Вихід очищеного CTLA-4-IgG1 варіював між приблизно 0,5 і 3мкг/л клітин CHO-K1.

(ii) Пептид CTLA-4:

Наступний пептид CTLA-4 отримували як описано нижче:

**NH₂ MHVAQPAVVVLASSRGLASFYCEYASPGKATEYRVTVLRLQADSOVT
EVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQYNLTIQGLRAMDTGLYICK
VELMYPPPPYYLGI GNGTQIYVIDPEPC-CONH₂**

Скорочення/матеріали:

NMP, N-метилпіролідон; TFE, 2,2,2-трифторетанол; DCM, дихлорметан; Fmoc, флуоренілметоксикарбоніл. Всі реактиви були поставлені Perkin Elmer за наступними виключеннями: TFE, Aldrich Chemical, смола Fmoc-PAL-PEG, Perseptive Biosystems. Для амінокислот, для яких були потрібні захисні групи бічних ланцюгів, застосовували Fmoc-Arg(PMC)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH і Fmoc-Tyr(tBu)-OH. Синтез пептиду:

Пептидний синтез проводили в апараті Perkin-Elmer 431A, забезпеченому системою зворотного моніторингу через поглинання в УФ при 301нм (детектор Perkin-Elmer Model 759A). Пептидну послідовність збирали на смолі

ЕМОС-PAL-PEG із застосуванням кондиційних циклів з подвійним приєднанням. Примусові подвійні приєднання проводили в циклах 10, 11, 18, 19, 20 і з 28 по 33. Смоли промивали 50% сумішшю DCM і TFE по завершенні кожного циклу ацилювання з подальшим копіюванням аміногруп, що не прореагували, оцтовим ангідридом в NMP. Смоли видаляли з реактора після завершення циклу 49, а залишок залишали до завершення реакції. Відділення пептиду від смоли проводили за допомогою реактиву К [King et al., International Journal of Protein and Peptide Research 36:255-266 (1990)] протягом 6 годин із застосуванням 415мг смоли, що дало 186мг сирого пептиду CTLA-4.

Характеристика пептиду:

25мг Аліквоти сирого пептиду CTLA-4 розчиняли в 5мл 6М гуанідин-НСІ/100мМ К₂РО₃ при рН6,4 і елюювали з колонки Pharmacia Hi Load Superdex 75 16/60 (16мм×600мм, об'єм шару 120мл) 2М гуанідин-НСІ/100мМ К₂РО₃ при рН6,4 з швидкістю 2мл/хв. протягом 180 хвилин при об'ємі фракцій, що збираються 5мл. Фракції аналізували нанесенням 1,7мкл фракцій на Nu-ПАГ для електрофорезу за Laemeli, що проводиться із застосуванням буфера MES, з візуалізацією забарвленням сріблом згідно з описом Daichii. Фракції з молекулярною вагою 12кДа, оціненою за стандартами молекулярної ваги, об'єднували і зберігали при 4°С. Об'єднані фракції аналізували з допомогою УФ і електрофорезу в гелі. Амінокислотне секвенування проводили за допомогою абсорбції 100 мікролітрового зразка патроном ProSorb (абсорбція мембраною PVDF) з промивкою для видалення солей буфера. Секвенування проводили на апараті Applied Biosystems 420. Виявлена очікувана N-кінцева послідовність (MHVAQPAWLA). З допомогою імуноблотінгу показано, що пептид впізнається BNI3 проти CTLA-4 людини (PharMingen). Для видалення солі аліквоту, що містить 648мкг матеріалу, вміщували в діалізну трубку 3500Da MWCO і діалізували проти 0,1% ТФУ/Н₂О при 4°С протягом 9 днів при перемішуванні. Весь зміст діалізного мішечка ліофілізували до отримання порошку.

(iii) Клітини 300.19, трансфіковані CTLA-4 (Y201V)

Повнорозмірну кДНК CTLA-4 ампліфікували за допомогою ПЛР з бібліотеки кДНК тимусу людини (Stratagene) і субклонували в pIRESneo (Clontech). Мутацію CTLA-4, що приводить до конститутивної експресії на клітинній поверхні, вводили з допомогою MatchMaker Mutagenesis System (Promega). Мутація, що викликає заміну тирозину Y201 на валін, гальмує скріплення адаптивного білка AP50, відповідального за швидку інтерналізацію CTLA-4 [Chuang et al., J. Immunol. 159: 144-151 (1997)]. Вільні від мікоплазми лімфомні клітини 300.19 миші культивували в середовищі RPMI-1640, що містить 10% плідної сироватки телят, замінивши амінокислоти, пеніцилін/стрептоміцин, 2мМ глутаміну, 12,5мМ Hepes рН7,5 і 25мкМ бета-меркаптоетанолу. Клітини електропорували (3×10⁶/0,4)мл безсироваткового середовища RPMI в 1-мл камері з 20мкг CTLA-4-Y201V/pIRESneo при 200 в/1180мкф (Gibco CellPorator). Клітини залишали на 10 хвилин і потім додавали 8мл заздалегідь нагрітого середовища RPMI. Через 48 годин клітини розводили до концентрації 0,5×10⁶/мл в повному середовищі RPMI, що містить 1мг/мл G418 (Gibco). За допомогою антитіла BNI3, кон'югованого з фікоеритрином (PharMingen) було показано, що розмножені резистентні клітини експресують CTLA-4 на клітинній поверхні. Із застосуванням стерильного сортування були виділені клітини з високим рівнем експресії.

Імунізація і отримання гібридом: мишей XenoMouse (у віці від 8 до 10 тижнів) імунізували (i) підшкірно в основу хвоста 1×10⁷ клітинами 300.19, які були трансфіковані як описано вище для експресії CTLA-4, ресуспендованими в забуференому фосфатом сольовому розчині (ЗФР) з повним ад'ювантом Фрейнда або (ii) підшкірно в основу хвоста (а) 10мкг гібридного білка CTLA-4 або (б) 10мкг білка CTLA-4, емульгованого з повним ад'ювантом Фрейнда. У кожному випадку введення дози повторювали три або чотири рази з неповним ад'ювантом Фрейнда. За чотири дні до проведення злиття мишам вводили останню ін'єкцію імуногену або клітин в ЗФР. Лімфоцити селезінки і/або лімфатичних вузлів імунованих мишей зливали з лінією клітин Р3 несекретуючої мієломи мишей і піддавали селекції HAT як описано раніше [Gafre, G. and Milstein, C, "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." Methods Enzymol., 73: 3-46 (1981)]. Був виявлений широкий набір гібридом, всі з яких секретували специфічні у відношенні CTLA-4 антитіла людини IgG2K або IgG4K (як визначено нижче).

ELISA аналіз: Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA аналіз) для визначення антитіл, специфічних у відношенні антигенна, в сироватці мишей і супернатантах гібридом проводили як описано [Coligan et al., Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays" in Current protocols in immunology (1994)] із застосуванням гібридного білка CTLA-4-Ig для захоплення антитіл. У випадку тварин, імунованих гібридним білком CTLA-4-Ig заявники проводили додатковий скринінг на предмет неспецифічної реакції проти людської Ig частини гібридного білка. Це робили із застосуванням планшет для ELISA, покритих IgG1 людини, як негативний контроль на специфічність.

У переважному ELISA аналізі застосовували наступні методи:

Планшети для ELISA покривають 100 IgG1/лунка антигену в буфері для покриття планшета (0,1М вуглекислий буфер, рН 9,6 і NaHCO₃ (м.в. 84) 8,4г/л). Потім планшети інкубують при 4°С протягом ночі. Після інкубації буфер для покриття видаляють, планшет блокують 200 мкл/лунка блокуючого буферу (0,5% БСА, 0,1% твін-20, 0,01% Thimerosal в 1×ЗФР) і інкубують при кімнатній температурі протягом 1 години. В іншому варіанті планшети зберігають в холодильнику з блокуючим буфером в герметичній упаковці планшета. Блокуючий буфер видаляють і додають 50мкл/лунка супернатанту гібридами, сироватки або іншого супернатанту гібридами (позитивний контроль) і середовища HAT або блокуючого буфера (негативний контроль). Планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 2 годин. Після інкубації планшет промивають буфером для промивки (1×ЗФР). Виявляюче антитіло (тобто, антитіло миші проти людського IgG2-HRP (SB, №9070-05) для антитіл IgG2 або антитіло миші проти людського IgG4-HRP (SB, №9200-05) для антитіл IgG4) додають в кількості

100мкл/лунка (антитіло миші проти людського IgG2-HRP 1:2000 або антитіло миші проти людського IgG4-HRP 1:1000 (кожне з яких розведено блокуючим буфером)). Планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 1 години і потім промивають буфером для промивки. Після цього в лунку додають по 100мкл/лунка свіжоприготованого виявляючого розчину (10мл буфера для субстрату, 5мг OPD (о-фенілендіамін, Sigma Cat No.P-7288) і 10мкл 30% H₂O₂ (Sigma)). Планшети залишають на 10-20 хвилин для розвитку забарвлення до моменту, коли в лунці негативного контролю ледве починає з'являтися забарвлення. Після цього додають 100мкл/лунка зупиняючого розчину (2M H₂SO₄) і прочитують показники за допомогою планшетного рідера для ELISA при довжині хвилі 490нМ.

Визначення констант спорідненості суцільних Mabs людини за допомогою BIAcore: Вимірювання спорідненості очищених моноклональних антитіл людини, Fab фрагментів або супернатантів гібридом за допомогою плазмонного резонансу, що проводиться із застосуванням апарату BIAcore 2000, слідуючи загальним процедурам, окресленим виробником.

Кінетичний аналіз антитіл проводили із застосуванням антигенів, імобілізованих на сенсорній поверхні при низькій щільності. Гібридний білок CTLA-4-Ig імобілізували на трьох поверхнях сенсорних чіпів BIAcore при щільності, що варіює від приблизно 390 до 900, із застосуванням гібридного білка CTLA-4-Ig в концентрації 20 або 50мкг/мл в 10мМ ацетаті натрію при pH5,0 із застосуванням аміно-з'єднуючого набору, що поставляється виробником (BIAcore, Inc.). На четвертій поверхні сенсорного чіпу BIAcore був імобілізований IgG1 (900 RU) і її застосовували в якості поверхні негативного контролю для неспецифічного скріплення. Кінетичний аналіз проводили при швидкості струму 25 або 50 мікролітрів на хвилину, а швидкості дисоціації (K_d або K_{off}) і асоціації (K_a або K_{on}) визначали із застосуванням програми, що надається виробником (BIA evaluation 3.0), яка забезпечує виконання загальнозастосовних розрахунків.

Приклад 2

Вимірювання спорідненості антитіл проти CTLA-4

У наступній таблиці представлені результати вимірювання спорідненості для деяких антитіл, вибраних цим способом

Таблиця I					
Тверда фаза (за BIAcore)					
Гібридома	Швидкості асоціації K _a (M ⁻¹ сек ⁻¹ ×10 ⁶)	Швидкості дисоціації iK _d (сек×10 ⁻⁴)	Константа асоціації K _A (1/M)=K _a /k _d ×10 ¹⁰	Константа дисоціації iK _D (M)=K _d /k _a ×10 ⁻¹⁰	Поверхнева щільність [RU]
Moab01	0,68	1,01	0,67	1,48	878,7
	0,70	4,66	0,15	6,68	504,5
	0,77	6,49	0,19	8,41	457,2
	0,60	3,08	0,20	5,11	397,8
4.1.1	1,85	0,72	2,58	0,39	878,7
	1,88	1,21	1,55	0,64	504,5
	1,73	1,54	1,13	0,88	457,2
	1,86	1,47	1,26	0,79	397,8
4.8.1	0,32	0,07	4,46	0,22	878,7
	0,31	0,23	1,33	0,75	504,5
	0,28	0,06	4,82	0,21	397,8
4.14.3	2,81	3,04	0,92	1,08	878,7
	2,88	3,97	0,73	1,38	504,5
	2,84	6,66	0,43	2,35	457,2
	3,17	5,03	0,63	1,58	397,8
6.1.1	0,43	0,35	1,21	0,83	878,7
	0,46	0,90	0,51	1,98	504,5
	0,31	0,51	0,61	1,63	457,2
	0,45	0,79	0,57	1,76	397,8
3.1.1	1,04	0,96	1,07	0,93	878,7
	0,95	1,72	0,55	1,82	504,5
	0,73	1,65	0,44	2,27	457,2
	0,91	2,07	0,44	2,28	397,8
4.9.1	1,55	13,80	0,11	8,94	878,7
	1,43	19,00	0,08	13,20	504,5
	1,35	20,50	0,07	15,20	397,8
4.10.2	1,00	2,53	0,39	2,54	878,7
	0,94	4,30	0,22	4,55	504,5
	0,70	5,05	0,14	7,21	457,2
	1,00	5,24	0,19	5,25	397,8
2.1.3	1,24	9,59	0,13	7,72	878,7
	1,17	13,10	0,09	11,20	504,5
	1,11	13,00	0,09	11,70	397,8

4.13.1	1,22	5,83	0,21	4,78	878,7
	1,29	6,65	0,19	5,17	504,5
	1,23	7,25	0,17	5,88	397,8

Як буде розглянуто, антитіла, отримані відповідно до винаходу, володіють високою спорідненістю і константами скріплення.

Приклад 3

Структура антитіл проти CTLA-4, отриманих відповідно до винаходу

У наступному обговоренні пропонуються відомості про структуру антитіл, отриманих відповідно до винаходу.

Для аналізу структури антитіл, отриманих відповідно до винаходу, заявники клонували гени, що кодують фрагменти важкого і легкого ланцюга поза конкретної гібридами. Клонування і секвенування генів проводили таким чином:

Полі(A)⁺ мРНК виділяли з приблизно 2×10^5 гібридомних клітин, отриманих від імунізованих мишей XenoMouse із застосуванням набору Fast-Track (Invitrogen). Отримання кДНК за допомогою випадкових затравок здійснювали за допомогою ПЛР. Специфічні у відношенні варіабельної області сімейств V_H людини або V_K людини праймери [Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes." Eur. J. Immunol. 21: 985-991 (1991)] або універсальний праймер V_H людини, MG-30 (CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG), застосовували в поєднанні з праймерами, специфічними для константної області C_{γ2} людини (MG-40d; 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3'), або константної області C_κ (hκP2; як описано раніше [y Green et al., 1994]). Послідовності транскриптів похідних Mabs людини важкої і легкої капа ланцюгів гібридом отримували прямим секвенуванням продуктів ПЛР, отриманих з полі(A⁺) РНК із застосуванням описаних вище праймерів. Продукти ПЛР клонували також в pCRII із застосуванням набору для клонування TA (Invitrogen), і обидва ланцюги секвенували із застосуванням наборів для секвенування Prizm dye-terminator і апарату для секвенування ABI377. Всі послідовності "аналізували шляхом порівняння з "V BASE sequence directory" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) із застосуванням комп'ютерних програм MacVector і Geneworks.

Далі, кожне з антитіл 4.1.1, 4.8.1, 11.2.1 і 6.1.1 піддавали повнорозмірному секвенуванню ДНК. Для кожного секвенування виділяли полі(A)⁺ мРНК з приблизно 4×10^5 гібридомних клітин із застосуванням набору mRNA Direct kit (Dynal). мРНК піддавали зворотній транскрипції із застосуванням оліго-dT(18) і набору Advantage RTVPCR kit (Clontech). Для створення праймерів ампліфікації, починаючи зі стартового сайту ATG гена DP50 важкого ланцюга (5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTG-3') і кінчаючи стоп-кодоном константної області IgG2 (5'-TTCTCTGATCAGAAATTCCTATCATTTACCCGAGACAGGGAGAGCT-3'), використали банк даних для варіабельної області (V Base). До 5-кінця стартового сайту ATG приєднували оптимальну послідовність Kozak (ACCGCCACC). Той же спосіб застосовували для створення праймера для стартового сайту ATG гена A27 капа ланцюга (5'-TCTTCAAGCTTGGCCGGGCGCCGCCACCATGGAAACCCAGCGCAG-3') і стоп-кодону константної області капа (5'-TTCTTTTGATCAGAAATTCCTCACTCTCCCTGTTGA-3'). кДНК 012 клонували із застосуванням праймера до стартовому сайту ATG (5'-TCTTCAAGCTTGGCCGGGCGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCGCT-3') і описаного вище праймеру до стоп-кодону константної області капа. кДНК важкого ланцюга клонували також у вигляді геномних конструкцій за допомогою сайт-направленого мутагенезу для введення сайту NheI в кінці варіабельного домену J і субклонування утримуючих фрагмент NheI геномних областей IgG2 CH1/Hinge/CH₂/CH₃. Крапкова мутація для створення сайту NheI не порушує амінокислотної послідовності початкової лінії. Для ампліфікації кДНК застосовували пари праймерів з використанням набору Advantage High Fidelity PCR Kit (Clontech). Послідовність продукту ПЛР визначали прямим секвенуванням за допомогою наборів Dye-terminator sequencing kits і апарату для секвенування ABI. Продукт ПЛР клонували в експресійні вектори глутамінсинтази рЕЕ ссавців (Lonza), і три клони секвенували для підтвердження соматичних мутацій. Для кожного клону послідовність бала перевірена для обох ланцюгів в, щонайменше, трьох реакціях. Неглікозильоване антитіло 4.1.1 було отримане сайт-направленим мутагенезом N294Q в домені CH₂. Рекомбінантні антитіла отримували скороминують трансфекцією клітин Cos7 в позбавленій IgG FCS і очищали за допомогою стандартних способів із застосуванням протеїн А-сефарози. Стабільні трансфектанти отримували електропорацією мишачих клітин NSO і селекцію в позбавленому глутаміну середовищі. Рекомбінантне антитіло 4.1.1 з глікозильованням або без нього виявляло однакові специфічність і спорідненість до CTLA4 в тестах ELISA і BIAcore in vitro.

Аналіз використання гена

У наступній таблиці представлені дані по використанню гена, отримані для окремих клонів гібридами відповідно до винаходу:

Таблица II					
Використання генів важкого і легкого ланцюгів					
Клон	Важкий ланцюг			Легкий Капа ланцюг	
	VH	D	JH	VK	JK
4.1.1	DP-50	DIR4 або DIR3	JH4	A27	JK1
4.8.1	DP-50	7-27	JH4	A27	JK4
4.14.3	DP-50	7-27	JH4	A27	JK3

6.1.1	DP-50	DIR5 або DIR5rc	JH4	A27	JK3
3.1.1	DP-50	3-3	JH6	012	JK3
4.10.2	DP-50	7-27	JH4	A27	JK3
2.1.3	DP-65	1-26	JH6	A10/A26	JK4
4.13.1	DP-50	7-27	JH4	A27	JK3
11.2.1	DP-50	D1-26	JH6	012	JK3
11.6.1	DP-50	D2-2 або D4	JH6	012	JK3
11.7.1	DP-50	D3-22 або D21-9	JH4	012	JK3
12.3.1.1	DP-50	D3-3 або DXF4	JH6	A17	JK1
12.9.1.1	DP-50	D6-19	JH4	A3/A 19	JK4
4.9.1	DP-47	5-24 i/a6o 6-19	JH4	L5	JK1

Як буде розглянуто нижче, антитіла відповідно до даного винаходу отримують з сильним зміщенням у бік використання варіабельної області важкого ланцюга DP-50. Ген DP-50 позначають також як ген сімейства V_H 3-33. Лише у випадку одного антитіла, яке було відібране на основі скріплення CTLA-4 і попередніх функціональних тестів *in vitro*, було показано використання гена важкого ланцюга, відмінного від DP-50. У цьому клоні, 2.1.3, використовується варіабельна область важкого ланцюга DP-65, і він відноситься до ізотипу IgG4. Ген DP-65 позначають також як ген сімейства V_H 4-31. З іншого боку, клон 4.9.1, який містить варіабельну область важкого ланцюга DP-47, зв'язується з CTLA-4, але не гальмує скріплення з B7-1 або B7-2. У мишей XenoMouse є не більше за 30 різних функціональних варіабельних генів важкого ланцюга, за участю яких утворюються антитіла. Таким чином, зміщення служить показником переважного мотиву скріплення при взаємодії антитіло-антиген відносно об'єднаних властивостей скріплення з антигеном і функціональній активності.

Мутаційний аналіз

Як буде розглянуто нижче, аналіз використання генів дає лише обмежене уявлення про структуру антитіл. Оскільки В-клітини тварин XenoMouse стохастично проводять транскрипти важкого V-D-J або легкого V-J капа ланцюгів, є ряд повторних процесів, включаючи, але, не обмежуючись цим, соматичну гіпермутацію, п-добавки і розширення CDR3. [Дивися, наприклад, Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997) і заявку на патент США №08/759620, зареєстровану 3 грудня 1996р.]. Відповідно, для подальшої оцінки структури антитіл отримували амінокислотні послідовності антитіл, що передбачаються на основі кДНК, отриманих з клонів. Крім того, шляхом секвенування білка отримували N-кінцеві амінокислотні послідовності.

На Фіг.1 представлені нуклеотидні і передбачені амінокислотні послідовності важкого і легкого капа ланцюгів клонів 4.1.1 (Фіг.1A), 4.8.1 (Фіг.1B), 4.14.3 (Фіг.1C), 6.1.1 (Фіг.1D), 3.1.1 (Фіг.1E), 4.10.2 (Фіг.1F), 2.1.3 (Фіг.1G), 4.13.1 (Фіг.1H), 11.2.1 (Фіг.1I), 11.6.1 (Фіг.1J), 11.7.1 (Фіг.1K), 12.3.1.1 (Фіг.1L) і 12.9.1.1 (Фіг.1M). На Фіг.1A, 1B і 1D розширені послідовності антитіл 4.1.1, 4.8.1 і 6.1.1 були отримані клонуванням повнорозмірних кДНК, як описано вище. На цих фігурах сигнальні пептидні послідовності позначені жирним шрифтом, а послідовності, ті, що використовуються для 5'ПЛР-реакції підкреслені.

На Фіг.2 представлене порівняння послідовностей передбаченої амінокислотної послідовності важкого ланцюга клонів 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії DP-50 (3-33). Відмінності між послідовністю батьківської лінії DP-50 і тією ж послідовністю в клонах позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіл у вигляді затінення.

На Фіг.3 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями важкого ланцюга клону 2.1.3 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії DP-65 (4-31). Відмінності між послідовністю батьківської лінії DP-65 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.4 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клонів 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 і 4.13.1 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії A27. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A27 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення. Уявні делеції в CDRs клонів 4.8.1, 4.14.3 і 6.1.1 позначені як "0s".

На Фіг.5 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клонів 3.1.1, 11.2.1, 11.6.1 і 11.7.1 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії 012. Відмінності між послідовністю батьківської лінії 012 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.6 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клону 2.1.3 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії A10/A26. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A10/A26 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.7 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клону 12.3.1 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії A17. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A17 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг. також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.8 представлене порівняння послідовностей між передбаченими амінокислотними послідовностями легкого капа ланцюга клону 12.9.1 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії A3/A 19. Відмінності між послідовністю батьківської лінії A3/A 19 і тією ж послідовністю в клоні позначені жирним шрифтом. На Фіг.

також вказані положення послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла у вигляді підкреслення.

На Фіг.22 представлені серії додаткових нуклеотидних і амінокислотних послідовностей наступних ланцюгів антитіл проти CTLA-4:

4.1.1:

повнорозмірний важкий ланцюг 4.1.1 (кДНК 22 (a), геномна ДНК 22(b) і амінокислотна послідовність 22(з));
повнорозмірний деглікозильований важкий ланцюг 4.1.1 (кДНК 22(d) і амінокислотна послідовність 22(е));
легкий ланцюг 4.1.1 (кДНК 22(f) і амінокислотна послідовність 22(г));

4.8.1:

повнорозмірний важкий ланцюг 4.8.1 (кДНК 22(h) і амінокислотна послідовність 22(i));
легкий ланцюг 4.8.1 (кДНК 22 (j) і амінокислотна послідовність 22(к));

6.1.1:

повнорозмірний важкий ланцюг 6.1.1 (кДНК 22(l) і амінокислотна послідовність 22(м));
легкий ланцюг 6.1.1 (кДНК 22(n) і амінокислотна послідовність 22(о));

11.2.1:

повнорозмірний важкий ланцюг 11.2.1 (кДНК 22 (p) і амінокислотна послідовність 22(q)); і
легкий ланцюг 11.2.1 (кДНК 22(r) і амінокислотна послідовність 22(s)).

Послідовності сигнальних пептидів позначені жирним і великим шрифтом. Відкриті рамки прочитання повнорозмірної послідовності геномної ДНК 4.1.1 (Фіг.22(b)) відмічені підкресленням. І, нарешті, мутації, введені для отримання аглікозильованого важкого ланцюга 4.1.1, і результуюча заміна (N294Q) відмічені подвійним підкресленням і жирним шрифтом (кДНК (Фіг.22(b) і амінокислотна послідовність (Фіг.22(c)).

Приклад 4

Аналіз замін амінокислот важкого і легкого ланцюгів

На Фіг.2, де представлено порівняння послідовностей передбаченої амінокислотної послідовності важкого ланцюга клонів 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 і 12.9.1.1 і амінокислотною послідовністю батьківської лінії DP-50 (3-33), розкривається цікава особливість. У доповнення до факту зміщення в більшості клонів у бік важкого ланцюга DP-50, є відносно обмежена гіпермутація антитіл в порівнянні з батьківським геном DP-50. Наприклад, в клонах 3.1.1 і 11.2.1 немає мутацій. Більш того мутації в інших клонах звичайно являють собою консервативні зміни, що включають заміни амінокислот батьківської лінії на амінокислоти зі схожими властивостями. Особливо консервативні за своєю природою мутації в багатьох послідовностях CDR1 і CDR2. Три важкі ланцюги, представлені на Фіг.2, 4.10.2, 4.13.1 і 4.14.3, явно беруть початок від одиночної події рекомбінації (тобто, походять від ідентичного початкового центра) і майже ідентичні по послідовності. Якщо ці три послідовності розглядати як одну, то серед 10 різних антитіл, що містять важкий ланцюг DP-50, в CDR1 і CDR2 є 3 положення, в яких неполярний залишок замінений на інший неполярний залишок, 12 положень, в яких полярний незаряджений залишок замінений на інший полярний незаряджений залишок, і 1 положення, в якому полярний заряджений залишок замінений на інший полярний заряджений залишок. Більш того є два положення, в яких два залишки, структурно дуже схожих, гліцин і аланін, замінені один одним. Єдині не суворо консервативні мутації включають 3 заміни полярного зарядженого залишку на полярний незаряджений залишок і одну заміну неполярного залишку на полярний залишок.

Легкі ланцюги цих антитіл беруть початок від 5 різних генів Vk. Ген A27 найбільш представлений і дає початок 6 різним легким ланцюгам. Порівняння цих 6 послідовностей дозволяє виявити дві примітних особливості. По-перше, в трьох з них, 4.8.1, 4.14.3 і 6.1.1, є делеції одного або двох залишків в CDR1, що є рідкою подією. По-друге, виникає підозра відносно серину батьківської лінії в положенні шість в CDR3 в тому плані, що серин був замінений в кожній послідовності. Це дозволяє передбачати, що серин в даному положенні не сумісний зі скріпленням CTLA4.

Потрібно усвідомлювати, що багато які із згаданих вище амінокислотних замін знаходяться в безпосередній близькості до CDR або всередині CDR. Схоже, що такі заміни могли б впливати певний чином на скріплення антитіла з молекулою CTLA-4. Більш того такі заміни могли б впливати істотний чином на спорідненість антитіл.

Приклад 5

Аналіз N-кінцевої амінокислотної послідовності антитіл відповідно до винаходу Для подальшої перевірки складу і структури вказаних вище антитіл відповідно до винаходу, заявники секвенували деякі з антитіл із застосуванням секвенатору Perkin-Elmer. Важкий і легкий капа ланцюги антитіл виділяли і очищали за допомогою методів препаративного електрофорезу в гелі і електроблотінгу, після чого піддавали прямому секвенуванню як описано в прикладі 6. Основна частина послідовностей важких ланцюгів була блокована по аміно-кінцю. Тому антитіла спочатку обробляли піроглутаматамінопептидазою і потім секвенували.

Результати цих експериментів показані на Фіг.9. На Фіг.9 також представлена молекулярна вага важкого і легкого ланцюгів, визначена мас-спектроскопією (MALDI).

Приклад 6

Додаткова характеристика антитіл відповідно до винаходу

На Фіг.10 представлена певна додаткова інформація за характеристикою деяких антитіл відповідно до винаходу. На Фіг. підсумовані дані у відношенні клонів 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.14.3 і 6.1.1. Представлені наступні дані: концентрація, результати ізоелектрофокусування (IEF), ДДС-Na-ПАГЕ, розмірно-ексклюзійної хроматографії, FACS, мас-спектроскопії (MALDI) і N-кінцеві послідовності легких ланцюгів.

Загалом дані були отримані таким чином:

Матеріали і методи

Концентрацію білка визначали при 280нм УФ-сканером (200-350нм), коли 1,58 одиниць поглинання при 280нм прирівнювали до 1мг/мл.

ДДС-На-ПАГЕ проводили із застосуванням електрофоретичної системи Novex NuPAGE з використанням 10% гелю NuPAGE і буфера розділення MES. Зразки готували розведенням 3:1 буфером для зразка 4×NuPAGE (+/-) бета-меркаптоетанол, нагрівали і наносили ~5мкг зразку на гель. Гель фарбували забарвлюючим розчином діамантового синього R (Sigma cat.ft B-6529), а визначення молекулярного розміру проводили шляхом порівняння забарвлених смуг з "Perfect Protein Markers" (Novagen cat№69149-3).

Для N-кінцевого секвенування зразки піддавали електрофорезу в гелях NuPAGE як описано вище, переносили на Pro Blot імобілізуючу мембрану (Applied Biosystems) і забарвлювали кумасі синім R-250. Забарвлені білкові смуги вирізали і піддавали секвенуючому аналізу за допомогою автоматизованої деградації за Edman із застосуванням апарату Applied Biosystems 494 Precise HT Sequencer.

Ізоелектричне фокусування (IEF) проводили з допомогою IEF 3-9 pHast gels (cat# 17-0543-01). Зразки розводили в 10% гліцерині до ~0,8мг/мл і 1мкл наносили на гель і потім забарвлювали сріблом. Визначення рІ проводили шляхом порівняння забарвлених смуг зі стандартами широкого діапазону (pH3-10) (Pharmacia cat# 17-0471-01).

Розмірно-ексклюзійну хроматографію (SEC) проводили в забуференому фосфатом фізіологічному розчині (ЗФР) в системі Pharmacia SMART із застосуванням колонки Superdex 75 PC 3.2/30. Визначення розміру молекул проводили шляхом порівняння часу затримки на піку із часом затримки гелю.

Для досліджень FACS отримували Т-клітини периферичної крові людини і стимулювали протягом 48 годин. Т-клітини одноразово промивали, ресуспендували в буфері FACS при концентрації 1×10^6 клітин/100мкл і забарвлювали на поверхневу експресію CD3 10мкл анти-CD3-FITC (Immunotech, Marseille, France) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Клітини двічі промивали, потім фіксували, спричиняли порушення проникності мембрани (Fix and Perm, Caltag) і забарвлювали на внутрішньоклітинну експресію CTLA-4 за допомогою anti-CD 152-PE (Pharmingen). Проточну цитометрію проводили за допомогою Becton Dickinson FACSort. Квадранти встановлювали за допомогою аналізу контрольних антитіл відповідного ізо типу (Caltag).

Як обговорювалося вище, було показано, що антитіла проти CTLA-4 володіють певною значною імунomodulatory активністю. Наступні експерименти проводили для з'ясування питання про те, чи володіють антитіла відповідно до даного винаходу такою активністю. Загалом експерименти були направлені на з'ясування здатності антитіл гальмувати взаємодію між молекулами CTLA-4 і B7, вибіркової між молекулами CTLA-4, B7 і CD28 і здібності спричинити утворення Т-клітинами цитокінів, включаючи, але, не обмежуючись цим, експресію ІЛ-2 і/або ІФН-γ. Крім того, було зроблене вивчення перехресної взаємодії антитіл винаходу з деякими тканинами людини і молекулами CTLA-4 інших видів (наприклад, миші і приматів).

Приклад 7

Конкурентний ELISA: гальмування взаємодії CTLA-4/B7-1 або B7-2 антитілами відповідно до даного винаходу

Аналіз in vitro проводили для з'ясування питання про те, чи здатні антитіла даного винаходу гальмувати скріплення CTLA-4 з B7-1 або B7-2. Як буде розглянуто нижче, можна було б чекати, що антитіла винаходу, здатні гальмувати скріплення CTLA-4 з молекулами B7, є кандидатами на імунну регуляцію через шлях CTLA-4. При аналізі застосовували наступні матеріали і методи:

Матеріали і методи

96-лункові планшети MaxiSorp (Nunc, Denmark, #439454) покривали 3нМ B7.1-Ig(G1) або B7.2-Ig(G1) (Repligen, Inc. Needham, MA) в ЗФР за Дульбекко і інкубували при 4°C протягом ночі. На 2 день B7-Ig видаляли, і планшети блокували 1% БСА плюс 0,05% Твін-20 в Д-ЗФР протягом двох годин. Планшети промивали тричі буфером для промивки (0,05% твін-20 в Д-ЗФР). Антитіло у відповідній для тестування концентрації і CTLA-4-Ig(G4) (кінцева конц. 0,3нМ) (Repligen, Inc. Needham, MA) заздалегідь змішували протягом 15 хвилин, потім додавали в покритий B7-Ig планшет (сумарний об'єм 60мкл) і інкубували при кімн. темп, протягом 1,5 годин. Планшети промивали тричі, додавали 50мкл від 1 до 1000-кратно розведеного антитіла миші проти IgG4 людини, міченої HRP, (Zyiaed, San Francisco, CA, #05-3820) і інкубували при кімн. темп, протягом 1 години. Планшети промивали тричі, додавали 50мкл субстрату пероксидази TMB Micro well (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD, #50-76-04) і інкубували при кімн. темп, протягом 20 хвилин, після чого в планшет додавали 50мкл 1н H₂SO₄. Планшети прочитували при 450нм з допомогою планшетного рідера Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Всі зразки аналізували в двох паралелях. Максимальний сигнал визначали по скріпленню CTLA-4-Ig у відсутність антитіла, що тестується. Неспецифічне скріплення визначали по поглинанню у відсутність CTLA-4-Ig і антитіла, що тестується.

Результати аналізу представлені в таблицях IIIA і IIIB. У таблиці IIIA показані результати для множини антитіл відповідно до винаходу. У таблиці IIIB показані результати порівняння антитіла 4.1.1 винаходу з антитілом 11.2.1 винаходу в окремому експерименті.

Таблиця IIIA			
Клон CTLA-4-Ig	Ізотип	CTLA4, B7.2 конкур. ELISA IC ₅₀ (нМ)	CTLA4, B7.1 конкур. ELISA IC ₅₀ (нМ)
CT3.1.1	IgG2	0,45±0,07(n=3)	0,63±0,10(n=2)
CT4.1.1	IgG2	0,38±0,06(n=5)	0,50±0,05(n=2)
CT4.8.1	IgG2	0,57±0,03(n=3)	0,17±0,28(n=2)
CT4.9.1	IgG2	Неконкурентне (n=3)	Неконкурентне (n=2)
CT4.10.2	IgG2	1,50±0,37(n=3)	3,39±0,31(n=2)

CT4.13.1	IgG2	0,49±0,05(n=3)	0,98±0,11(n=2)
CT4.14.3	IgG2	0,69±0,11(n=3)	1,04±0,15(n=2)
CT6.1.1	IgG2	0,39±0,06(n=3)	0,67±0,07(n=2)

Таблиця IIIB				
Клон	CTLA-4-Ig	Ізотип	CTLA4, B7.2 конкур. ELISA IC ₅₀ (нМ)	CTLA4, B7.1 конкур. ELISA IC ₅₀ (нМ)
	CT4.1.1	IgG2	0,55±0,08(n=4)	0,87±0,14(n=2)
	CT11.2.1	IgG2	0,56±0,05(n=4)	0,81±0,24(n=2)

Приклад 8

Співвідношення вибіркості антитіл винаходу у відношенні CTLA-4 в порівнянні з CD28 або B7-2

Інший аналіз in vitro проводили для визначення вибіркості антитіл винаходу у відношенні CTLA-4 в порівнянні з CD28 або B7-2. У зв'язку з експериментами застосовували наступні матеріали і методи:

ELISA вибіркості CTLA-4: матеріали і методи

96-лунковий планшет FluroNUNC (NUNC Cat No.475515) покривали чотирма антигенами: CTLA-4/Ig, CD44/Ig, CD28/Ig і B7.2/Ig (антигени, отримані власними силами). Покриття планшета антигенами проводили протягом ночі при +4°C при концентрації 1мкг/мл, 100мкл/лунка в 0,1 М натрій-бікарбонатному буфері, pH9,6. Планшет потім промивали 3ФРТ (3ФР+0,1% твін-20) тричі із застосуванням промивного пристрою для планшет NUNC. Планшет блокували 3ФРТ+0,5% БСА в кількості 150мкл, лунка. Планшет інкубували при кімн. темп, протягом 1 години і потім промивали тричі 3ФРТ. Потім антитіла проти CTLA-4 по винаходу розводили в один прийом до концентрації 1мкг/мл і додавали в планшет. Планшет інкубували при кімн. темп, протягом 1 години і потім промивали тричі 3ФРТ. Лунки, що містили антитіла винаходу, обробляли потім 100мкл/лунка анти-IgC2-HRP людини (Southern Biotech Cat No.9070-05) при розведенні в один прийом 1:4000. Один ряд обробляли також антитілом проти IgG людини (Jackson Cat No.209-035-088) для нормування покриття планшет. Це антитіло розводили відразу 1:5000 і додавали в кількості 100мкл/лунка. Один ряд обробляли також антитілом з HRP проти CTLA-4 людини (Pharmingen Cat No.345815, Custom HRP conjugated) як позитивний контроль. Антитіло застосовували в концентрації 0,05мкг/мл після розведення в один прийом. Планшет інкубували при кімн. темп, протягом 1 години і потім промивали тричі 3ФРТ. Додавали хемілюмінесцентний субстрат LBA (Pierce) в кількості 100мкл/лунка і планшет інкубували на струшуванні протягом 5 хв. Потім знімали показники з планшета із застосуванням люменометру при 2-хв. експозиції.

Аналіз вибіркості скріплення CTLA-4-Ig за допомогою IGEN: матеріали і методи M-450 Dynabeads (Dyna A.S, Oslo, Norway №140.02) тричі промивали Na-фосфатним буфером, pH7,4, і ресуспендували в Na-фосфатному буфері. До 100мкл кульок додавали 1,0мкг CTLA-4-Ig(GI), 1,0мкг CD28-Ig(GI) або від 1,0 до 3,0мкг B7.2-Ig(GI) (Repligen, Inc. Needham. MA) і інкубували протягом ночі на ротаторі при 4°C. На 2-й день кульки промивали тричі 1% БСА плюс 0,05% твін-20 в 3ФР за Дульбекко і блокували протягом 30 хвилин. Кульки розводили 1-10-кратно блокуючим буфером і в поліпропіленові пробірки 12x75мм вносили по 25мкл покритих кульок. Всі зразки тестували в двох паралелях. У пробірки додавали 50мкл тестуючого антитіла (кінцева концентрація 1мкг/мл) або блокуючого буфера і інкубували протягом 30 хвилин на карусельному Origen 1.5 Analyzer (IGEN International, Inc., Gaithersburg, MD) при кімн. темп, при перемішуванні з швидкістю 100об./хв. У пробірки додавали 25мкл оброблених рутенієм антитіл миші проти IgG1, IgG2 або IgG4 людини (Zymed, Inc. San Francisco, CA №05-3300, 05-3500 і 05-3800) (кінцева концентрація 3мкг/мл в сумарному об'ємі 100мкл). Пробірки інкубували протягом 30 хвилин при кімн. темп, на карусельному перемішувачі зі швидкістю 100об./хв. Додавали 200мкл буферу для аналізу Origen (IGEN International, Inc., Gaithersburg, MD #402-050-03) на пробірку, недовго перемішували, після чого пробірки використали для підрахунку в Origen Analyzer і для кожної пробірки визначали значення ECL (електрохемілюмінесценції). Для поправок на відмінності в скріпленні гібридних білків з Dynabeads визначали фактори нормалізації, і перед розрахунками відносин вибіркості проводили корекцію значення ECL на неспецифічне скріплення. Результати аналізів представлені в таблицях IVA і IVB

Таблиця IVA						
Клон	Ізотип	CTLA4/CD28 ELISA	CTLA4/B7.2 ELISA	CTLA4/CD44 ELISA	CTLA4/CD 28 IGEN	CTLA4/B7.2 IGEN
3.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=1) 195:1 (n=1)
4.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2) 485:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1) 261:1 (n=1)	>500:1 (n=1) 107:1 (n=1)
4.8.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2) 190:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=2)
4.9.1	IgG2	>500:1 (n=2) 244:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 33:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1)	>500:1 (n=1)
4.10.2	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1)	>500:1 (n=1)
4.13.1	IgG2	>500:1 (n=2) 46:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1) 329:1 (n=1)	>500:1 (n=2)
4.14.3	IgG2	>500:1 (n=2) 80:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 10:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 126:1 (n=1)	>413:1 (n=1)	>234:1 (n=1)

6.1.1	IgG2	>500:1 (n=2) 52:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=2)
-------	------	----------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------

5

Таблиця IVB				
Клон	Ізотип	CTLA4/CD28 ELISA	CTLA4/B7.2 ELISA	CTLA4/hlgG ELISA
4.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=3)
11.2.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)

10

Приклад 9

Модель сигналізації Т-клітин людини

Для додаткового визначення активності антитіл відповідно до винаходу як імунних регуляторів заявники розробили ряд тестів для Т-клітин з метою кількісної оцінки підвищення утворення ІЛ-2 Т-клітинами після блокади сигналу CTLA-4 антитілами. У зв'язку з експериментами застосовували наступні матеріали і методи:

15

Матеріали і методи

Свіжовиділені Т-клітини людини отримували з використанням Histopaque (Sigma, St. Louis, MO №A-70543) і T-kwik (Lympho-Kwik, One Lambda, Canoga Park, CA, №LK-50-T) і стимулювали PHA (1мкг/мл) (Purified Phytohemagglutinin, Murex Diagnostics Ltd. Dartford, England, #HA 16) в середовищі (RPMI 1640, що містить L-глутамін, замінені амінокислоти MEM (мінімального підтримуючого середовища), пеніцилін, стрептоміцин, 25мМ Непес і 10% FBS (телячої плідної сироватки)) при концентрації 1×10^6 клітин/мл і інкубували при 37°C протягом 2 днів. Клітини промивали і розводили в середовищі до концентрації 2×10^6 клітин/мл. Клітини Raji (лімфома Беркитта людини, ATCC No.:CCL 86 Class II American Type Culture Collection Rockville, MD) обробляли мітоміцином С (Sigma, St. Louis, MO № M-4287) (25мкг/мл) протягом однієї години при 37 °C. Клітини Raji промивали 4-кратно в 3ФР і ресуспендували при концентрації 2×10^6 клітин/мл. Т-лімфобласти людини (5×10^4 /мл), клітини Raji (5×10^5 /мл) і антитіл проти CTLA-4 або відповідні за ізотипом контрольні антитіла при різних концентраціях додавали в 96-лункові мікропланшети, і планшети інкубували при 37°C протягом 72 годин. Сумарний об'єм на лунку становив 200мкл. Через сімдесят дві години після стимуляції планшети центрифугували, супернатант відділяли і заморожували для подальшого визначення ІЛ-2 (Quantikine IFN-g ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, #D2050) і IFN- γ (Quantikine IFN-g ELISA kit, R&D Systems). Підвищення цитокінів визначали по різниці між рівнем цитокінів в культурах, що містять блокуюче mAb проти CTLA-4 і контрольне антитіло відповідного ізотипа. Для експериментів з проточною цитометрією клітини Raji промивали однократно буфером FACS (3ФР, що містить 2% термоінактивовану телячу плідну сироватку і 0,025% азид натрію). Клітини ресуспендували в буфері FACS в концентрації 1×10^6 клітин/100мкл і інкубували з 10мкл анти-СБ80-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA) або анти-СБ86-PE (PharMingen, San Diego, CA) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Клітини промивали двічі і ресуспендували в 1мл буфери FACS. Проточну цитометрію проводили за допомогою Becton Dickinson FACSort. Маркери гістограми встановлювали аналізом контрольних антитіл відповідного ізотипа (Caltag, Burlingame, CA).

35

Загалом, заявники розробили спосіб аналізу, який може бути застосований для швидкого визначення позитивної регуляції ІЛ-2 в Т-клітинах. Як це буде ясне, стимуляція Т-клітин є В7- і CD28-залежною. Крім того, промиті Т-лімфобласти не проводять ІЛ-2 у вимірюваних кількостях, а клітини Raji не проводять ІЛ-2 у вимірюваних кількостях навіть після стимуляції LPS або PWM. Однак в поєднанні, Т-лімфобласти, що культивуються спільно і клітини Raji можуть моделювати сигнальні події з В7, CTLA-4 і CD28, і дію на них антитіл може бути визначено.

45

На Фіг.11 представлена експресія В7-1 і В7-2 на клітинах Raji із застосуванням mAbs проти CD-80-PE і CD86-PE із застосуванням проточної цитометрії (FACs) як описано в прикладі 6.

На Фіг.12 представлено залежне від концентрації збільшення продукції ІЛ-2 в тесті Т-лімфобластів/клітина Raji, індукване блокуючими антитілами проти CTLA-4 (BNI3, (PharMingen) і антитілами винаходу 4.1.1, 4.8.1 і 6.1.1).

50

На Фіг.13 представлено залежне від концентрації збільшення продукції IFN- γ в тесті Т-лімфобластів/клітина Raji, індукване блокуючими антитілами проти CTLA-4 (BNI3, (PharMingen) і антитілами винаходу 4.1.1, 4.8.1 і 6.1.1) (той же донор Т-клітин).

На Фіг.14 представлено середнє збільшення продукції ІЛ-2 Т-клітинами від 6 донорів, індукване блокуючими антитілами проти CTLA-4, в тесті Т-лімфобластів/клітина Raji. Цікаво зазначити, що mAb СТ4.9.1 зв'язується з CTLA4, але не блокує скріплення В 7. Таким чином, просте скріплення з CTLA-4 саме по собі є недостатнім для отримання функціонального антитіла винаходу.

55

На Фіг.15 представлено середнє збільшення продукції INF- γ Т-клітинами від 6 донорів, індукване блокуючими антитілами проти CTLA-4, в тесті Т-лімфобластів/клітина Raji,

60

На Фіг.19 представлено порівняння антитіл винаходу 4.1.1 і 11.2.1 при концентрації 30мкг/мл в 72-годинному тесті Т-лімфобластів/клітина Raji, як описано тут в прикладі 9, і в тесті суперантигену, як описано в прикладі 10.

На Фіг.20 представлено залежне від концентрації підвищення утворення ІЛ-2 в тесті Т-лімфобластів/клітина Raji, індукваних антитілами винаходу 4.1.1 і 11.2.1 CTLA4.

65

У наступній таблиці IVc представлена інформація, що стосується середнього збільшення і діапазону збільшення відповіді цитокіну в тестах Raji і SEA винаходу. Кожний з включених в результати експериментів

засновується на дозі антитіла 30мкг/мл і вимірюванні через 72 години. Показані кількість використаних в експериментах донорів і відповідей.

Таблиця Іvс						
Тест	mAb	Цитокін	Середнє підвищення пг/мл	SE M	Діапазон підвищення пг/мл	Відповідь донорів
Т-лімфоцити/ Raji	4.1.1	ІЛ-2	3329	408	0-8861	42 з 21
Т-лімфоцити/ Raji	4.1.1	ІЛ-2	3630	980	600-13939	17 з 13
Т-лімфоцити/ Raji	11.2.1	ІЛ-2	3509	488	369-6424	18 з 14
SEA (PBMC)	4.1.1	ІЛ-2	2800	312	330-6699	42 з 17
SEA (PBMC)	11.2.1	ІЛ-2	2438	366	147-8360	25 з 15
SEA (суцільна кров)	4.1.1	ІЛ-2	6089	665	-168-18417	46 з 17
SEA (суцільна кров)	11.2.1	ІЛ-2	6935	700	-111-11803	25 з 14

Приклад 10

Сигнальна модель Т-клітин людини

Заявники розробили другий клітинний тест для кількісного визначення підвищення освіти ІЛ-2 Т-клітинами внаслідок блокади сигналу CTLA-4 антитілами. У зв'язку з експериментами застосовували наступні матеріали і методи:

Матеріали і методи

PBMC людини отримували з допомогою Accuspin. Планшети для мікротитрування заздалегідь покривали антитілом проти CD3 (Ieu4, Becton Dickinson) (60нг/мл) і інкубували протягом 2 годин при 37°C. У лунки додавали hPBMC в кількості 200000 клітин на лунку. У лунки додавали ентеротоксин A Staphylococcus (SEA) (Sigma) в концентрації 100нг/мл. У лунки додавали антитіла, звичайно в концентрації 30мкг/мл. Потім клітини стимулювали протягом 48, 72 або 96 годин. Планшети центрифугували в бажаний час, і з лунок видаляли супернатант. Після цього супернатанти перевіряли на утворення ІЛ-2 за допомогою ELISA (R&D Systems).

Результати цих експериментів показані на фігурах 16, 17 і 21. На Фіг.16 індукцію утворення ІЛ-2 в hPBMC від 5 донорів вимірювали через 72 години після стимуляції. На Фіг.17 показані результати вимірювання на суцільній крові з аналізом різниці в індукції утворення ІЛ-2 в крові від 3 донорів, виміряного через 72 і 96 годин після стимуляції.

На Фіг.21 показане підвищення утворення ІЛ-2 в суцільній крові від 2 донорів, виміряного через 72 години після стимуляції.

Приклад 11

Модель пухлини тварини

Заявники створили модель пухлини тварини для in vivo аналізу гальмування пухлинного зростання під дією антитіла проти CTLA-4 миші. У цій моделі вирощують мишачу фібросаркомну пухлину, і тварин обробляють антитілами проти CTLA-4 миші. Матеріали і методи для створення моделі пропонуються нижче:

Матеріали і методи

Самицям миші лінії A/J (6-8-тижневі) вводили підшкірно у верхню частину шиї 0,2мл пухлинних клітин SalN (1x10⁶) (Baskar 1995). Через 0, 4, 7 і 14 днів після введення пухлинних клітин вводили антитіло проти CTLA-4 миші або контрольне антитіло відповідного ізотипа (PharMingen, San Diego, CA, 200мкг/тварина). Вимірювання пухлини проводили протягом 3-4 тижнів експерименту за допомогою електронного кавернометру Starrett SPC Plus (Athol, MA), і розмір пухлини виражали у вигляді площі поверхні, охопленої пухлинним зростанням (мм²).

На Фіг.18 показано гальмування зростання пухлини під дією антитіла проти CTLA-4 миші на моделі фібросаркомної пухлини миші. Як показано на Фіг.18, у тварин, оброблених антитілом проти CTLA-4, відбувалося зниження зростання пухлини в порівнянні з тваринами, обробленими контрольним антитілом відповідного ізотипа. Отже, mAbs проти CTLA-4 миші здатні гальмувати зростання фібросаркоми на моделі пухлини миші.

Очікується, що антитіла, які перехресно реагують з CTLA-4 миші, діють схоже в даній моделі. Однак серед антитіл винаходу, перевірених на перехресну реактивність, не було перехресно реагуючих з CTLA-4 миші.

Приклад 12 Модель пухлини тварини

Для подальшого дослідження активності антитіл відповідно до винаходу була розроблена ксенотрансплантатна модель на мишах SCID для визначення придушення розвинених пухлин і виникаючих від них метастазів. У цій моделі мишам лінії SCID пересаджували Т-клітини людини і імплантували отримані від хворих недрібноклітинні клітини легень (NSCL) або клітини карциноми прямої кишки (CC). Імплантацію здійснюють в гонадальні жирові подушечки мишей SCID. Пухлинам дають вирости і потім їх видаляють. У мишей розвиваються схожа з людською пухлина і метастази в печінці. Така модель описана [Bumpers et al J. Surgical Res. 61: 282-288 (1996)].

Очікується, що антитіла винаходу повинні гальмувати зростання пухлин, утворених у таких мишей.

Включення за посиланням

Всі цитовані тут посилання, включаючи патенти, патентні заявки, статті, керівництва і ним подібне, і цитовані в них посилання в тій мірі, що вони не є прямими, включені тут як посилання у всій їх повноті. Крім того, наступні посилання також включені тут як посилання у всій їх повноті, включаючи посилання, цитовані в таких посиланнях:

Alegre et al. J. Immunol 157: 4762-70 (1996)

Allison and Krummel Science 270: 932-933 (1995)

Balzano et al. Int J Cancer Suppl 7: 28-32 (1992)

- Blair et al. J. Immunol 160: 12-5 (1998)
 Blake and Litz-Davis Bio Conjugate Chem. 3: 510-513 (1992)
 Boussiotis et al. Proc Natl AcadSci USA 90: 11059-63 (1993)
 5 Bowie et al. Science 253: 164 (1991)
 Bruggeman et al. PNAS USA 86: 6709-6713 (1989)
 Bruggeman, M. and Neuberger, M.S. in Methods: A companion to Methods in Enzymology 2: 159-165 (Lemcr et al., eds. Academic Press (1991))
 Bruggemann et al., "Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH
 10 locus." Eur. J. Immunol. 21: 1323-1326 (1991)
 Bruggemann, M. and Neuberger, M.S. "Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice." Immunology Today 17: 391-397 (1996)
 Brunet et al. Nature 328: 267-270 (1987)
 Bumpers et al. J. Surgical Res. 61: 282-288 (1996)
 15 Capsey et al. Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press. NY (1988))
 Castan et al. Immunology 90: 265-71 (1997)
 Cepero et al. J. Exp Med 188: 199-204 (1998)
 Chen et al. "Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the J_H locus" International Immunology 5: 647-656(1993)
 20 Chen et al. Cell 71: 1093-1102 (1992)
 Chen et al. Human Gene Therapy 5: 595-601 (1994)
 Chiswell and McCafferty TIBTECH 10: 80-84 (1992)
 Choi et al. "Transgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome" Nature Genetics 4: 117-123 (1993)
 25 Chothia & Lesk. J. Mol. Biol 196: 901-917 (1987)
 Chothia et al. Nature 342: 878-883 (1989) Chuang et al. J. Immunol 159: 144-151(1997)
 Coligan et al., Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays, " in Current protocols in immunology (1994)
 Cwiria et al. PNAS USA 87: 6378-6382 (1990) Dariavach et al. Eur. J. Immunol 18:1901-1905(1988)
 Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp.101-110 (Volume 5, National Biomedical
 30 Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp.1-10
 de Boer et al. Eur J Immunol 23: 3120-5 (1993)
 Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991))
 Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)
 Fallarino et al. J.Exp Med 188: 205-10 (1998)
 35 Fanger et al. Immunol Methods 4: 72-81 (1994)
 Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986)
 Fishwild et al., "High-avidity human IgG monoclonal antibodies from a novel strain ofminilocus transgenic mice." Nature Biotech. 14: 845-851 (1996).
 Freeman et al. J. ExpMed 178: 2185-92 (1993)
 40 Freeman et al. J. Immunol 161: 2708-15 (1998)
 Freeman et al. Science 262: 907-9 (1993)
 Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press,
 Galfre, G. and Milstein, 3., "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." Methods
 Enzymol. 73: 3-46 (1981)
 45 German et al. P.N.A.S. 79:6777 (1982)
 Green and Jakobovits. J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998)
 Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994)
 Grosschedl et al. Cell 41: 885 (1985)
 Hanes and Plutchau PNAS USA 94: 4937-4942 (1997)
 50 Harding et al. Nature 356: 607-609 (1994)
 Harper et al. J. Immunol 147: 1037-44 (1991)
 Hathcock et al. Science 262: 905-7 (1993)
 Hoganboom et al. Immunol. Reviews 130: 43-68 (1992)
 Horspool et al. J. Immunol 160: 2706-14 (1998)
 55 Houghten et al. Biotechniques 13: 412-421 (1992)
 Houghten PNAS USA 82: 5131-5135 (1985)
 Hurwitz et al. JNeuroimmunol 73: 57-62 (1997)
 Hurwitz et al. Proc Natl AcadSci USA 95: 10067-71 (1998)
 Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland,
 60 Mass. (1991))
 Introduction to Protein Structure (3. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York,
 Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast
 artificial-chromosome." Nature 362: 255-258 (1993)
 Jakobovits, A. et al., "Analysis of homozygous mutant emmeric mice: Deletion of the immunoglobulin
 65 heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:
 2551-2555 (1993)

- Jakobovits, A., "Humanizing the mouse genome." *Current Biology* 4: 761-763 (1994)
- Jakobovits, A., "Production of fully human antibodies by transgenic mice." *Current Opinion in Biotechnology* 6: 561-566 (1995)
- 5 Junghans et al. in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafher and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))
- Rabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. publication no. 91-3242
- Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))
- 10 Kostelny et al. *J. Immunol* 148: 1547-1553 (1992)
- Krummel and Allison *J. Exp Med* 182: 459-65 (1995)
- Krummel et al. *Int Immunol* 8: 519-23 (1996)
- Kuchroo et al. *Cell* 80: 707-18 (1995)
- Kwon et al. *PNAS USA* 94: 8099-103 (1997)
- 15 LaPlanche et al. *Nucl. Acids Res.* 14: 9081 (1986)
- Lenschow et al. *Proc Natl AcadSci USA* 90: 11054-8 (1993)
- Lenschow et al. *Science* 257: 789-792 (1992)
- Lin et al. *J. Exp Med* 188: 199-204 (1998)
- Linsley et al. *J. Exp Med* 176: 1595-604 (1992)
- 20 Linsley et al. *Exp. Med.* 174: 561-569 (1991)
- Linsley et al. *Science* 257: 792-795 (1992)
- Liu et al. *J. Immunol.* 139: 3521 (1987)
- Liu et al. *P.N.A.S.* 84: 3439 (1987)
- 25 Lonberg et al., "Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications." *Nature* 368: 856-859 (1994).
- Luhder et al. *J. Exp Med* 187: 427-32 (1998)
- Marasco *Gene Therapy* 4: 11-15 (1997)
- Markees et al. *J. Invest* 101: 2446-55 (1998)
- Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes." *Em. J. Immunol.* 21: 985-991 (1991)
- 30 McCoy et al. *J. Exp Med* 186: 183-7 (1997)
- Mendez et al. *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997)
- Needleman and Wunsch. *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970)
- 35 Okayama et al. *Mol. Cell Bio.* 3: 280 (1983)
- Parmley and Smith *Gene* 73: 305-318 (1988)
- Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 2444 (1988)
- Perez et al. *Immunity* 6: 411-7 (1997)
- Perrin et al. *Immunol Res* 14: 189-99 (1995)
- 40 Perrin et al. *J Immunol* 157: 1333-6 (1996)
- Pinallactal. *Biotechniques* 13: 901-905 (1992)
- Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))
- Razi-Wolf et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11182-6 (1993)
- Remington's *Pharmaceutical Sciences* (15th ed. Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularly
- 45 Chapter 87 by Blaug, Seymour
- Rizo and Gierasch. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992)
- Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21: 1081-1085 (1993)
- Schwartz *Cell* 71: 1065 (1992)
- Scoti *TIBS* 17: 241-245 (1992)
- 50 Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)
- Songsivilai & Lachmann *Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990)
- Stec et al. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 6077 (1984)
- Stein et al. *Nucl. Acids Res.* 16: 3209 (1988)
- Taylor et al., "A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins." *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295 (1992)
- 55 Taylor et al., "Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM." *International Immunology* 6: 579-591 (1994)
- The McGraw-Hill *Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))
- Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991)
- 60 Tivol et al. *Immunity* 3: 541-7 (1995)
- Townsend and Allison *Science* 259: 368 (1993)
- Traunecker et al. *Int J. Cancer (Suppl.)* 7: 51-52 (1992)
- Tuailon et al. "Analysis of direct and inverted DJH rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus." *J. Immunol.* 154: 6453-6465 (1995)
- 65 Tuailon et al., "Human immunoglobulin heavy-chain mini locus recombination in transgenic mice: gene-segment use in? and? transcripts." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-3724(1993)

- Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990)
 Van Parijs et al. J.Exp Med 186: 1119-28 (1997)
 Veber and Freidinger TINS p.392 (1985)
 5 Vitetta Immunol Today 14: 252 (1993)
 Walunas et al. Immunity 1: 405-13 (1994)
 Walunas et al. J.Exp Med 183: 2541-50 (1996)
 Waterhouse et al. Science 270: 985-988 (1995)
 Winter and Hams Immunol Today 14: 43-46 (1993)
 10 Wright et al. Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992)
 Yang et al. Cancer Res 57: 4036-41 (1997)
 Yi-qun et al. Int Immunol 8: 37-44 (1996)
 Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991)
 Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp.87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford
 15 University Press, Oxford England (1991))
 Fry et al. "Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a
 new class of tyrosine kinase inhibitor" Proc Natl Acad Sci USA 95: 12022-7 (1998)
 Hoffman et al. "A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the
 presence of a rhodanese homology domain" J.Mol Biol 282: 195-208 (1998)
 20 Ginalski et al. "Modelling of active forms of protein kinases: p38--a case study" Acta Biochim Pol 44: 557-64 (1997)
 Jouko et al. "Identification of csk tyrosine phosphorylation sites and a tyrosine residue important for
 kinase domain structure" Biochem J 322: 927-35 (1997)
 Singh et al. "Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic
 domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases" J.Med Chem 40: 1130-5(1997) .
 25 Mandel et al. "ABGEN: a knowledge-based automated approach for antibody structure modeling" Nat
 Biootechnol 14: 323-8 (1996)
 Monfardini et al. "Rational design, analysis, and potential utility of GM-CSF antagonists" Proc Assoc Am
 Physicians 108: 420-31 (1996)
 Furet et al. "Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of
 30 the selectivity of CGP 52411" J Comput Aided Mol Des 9: 465-72 (1995)
 Ill et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and
 light chain variable regions" Protein Eng 10: 949-57 (1997)
 Martin et al., "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" EMBO J
 13: 5303-9 (1994)
 35 Патентна заявка США, No.07/466008, зареєстрована 12 січня 1990 р.
 Патентна заявка США, No.07/574748, зареєстрована 29 серпня 1990 р.
 Патентна заявка США, No.07/575962, зареєстрована 31 серпня 1990р.
 Патентна заявка США, No.07/610515, зареєстрована 8 листопада 1990р.
 Патентна заявка США, No.07/810279, зареєстрована 17 грудня 1991р.
 40 Патентна заявка США, No.07/853408, зареєстрована 18 березня 1992р.
 Патентна заявка США, No.07/904068, зареєстрована 23 червня 1992р.
 Патентна заявка США, No.07/919297, зареєстрована 24 липня 1992р.
 Патентна заявка США, No.07/922649, зареєстрована 30 липня 1992р.
 Патентна заявка США, No.07/990860, зареєстрована 16 грудня 1992р.
 45 Патентна заявка США, No.08/031801, зареєстрована 15 березня 1993р.
 Патентна заявка США, No.08/053131, зареєстрована 26 квітня 1993р.
 Патентна заявка США, No.08/096762, зареєстрована 22 липня 1993 р.
 Патентна заявка США, No.08/112848, зареєстрована 27 серпня 1993 р.
 Патентна заявка США, No.08/155301, зареєстрована 18 листопада 1993 р.
 50 Патентна заявка США, No.08/161739, зареєстрована 3 грудня 1993р.
 Патентна заявка США, No.08/165699, зареєстрована 10 грудня 1993р.
 Патентна заявка США, No.08/209741, зареєстрована 9 березня 1994р.
 Патентна заявка США, No.08/234145, зареєстрована 28 квітня 1994р.
 Патентна заявка США, No.08/724752, зареєстрована 2 жовтня 1996р.
 55 Патентна заявка США, No.08/730639, зареєстрована 11 жовтня 1996р.
 Патентна заявка США, No.08/759620, зареєстрована 3 грудня 1996р.
 Патентна, заявка США, No.08/759620, зареєстрована 3 грудня 1996р.
 Патент США No.4399216
 Патент США No.4681581
 60 Патент США No.4683195
 Патент США No.4683202
 Патент США No.4735210
 Патент США No.4740461
 Патент США No.4816397
 65 Патент США No.4912040
 Патент США No.4959455

Патент США No.5101827
Патент США No.5102990 (RE 35500)

Патент США No.5151510

Патент США No.5194594

Патент США No.5434131

Патент США No.5530101

Патент США No.5545806

Патент США No.5545807

Патент США No.5585089

Патент США No.5591669

Патент США No.5612205

Патент США No.5625126

Патент США No.5625825

Патент США No.5633425

Патент США No.5643763

Патент США No.5648471

Патент США No.5661016

Патент США No.5693761

Патент США No.5693792

Патент США No.5697902

Патент США No.5703057

Патент США No.5714350

Патент США No.5721367

Патент США No.5733743

Патент США No.5770197

Патент США No.5770429

Патент США No.5773253

Патент США No.5777085

Патент США No.5789215

Патент США No.5789650 Патент США No.5811097

Європейський патент No.EP 0 546 073 B1

Європейський патент No.EP 0 463 151 B1, присудження опубліковане 12 червня 1996р.

Заявка на міжнародний патент No.WO 92/02190

Заявка на міжнародний патент No.WO 92/03918

Заявка на міжнародний патент No.WO 92/22645

Заявка на міжнародний патент No.WO 92/22647

Заявка на міжнародний патент No.WO 92/22670

Заявка на міжнародний патент No.WO 93/00431

Заявка на міжнародний патент No.WO 93/12227

Заявка на міжнародний патент No.WO 94/00569

Заявка на міжнародний патент No.WO 94/02602, опублікована 3 лютого 1994р.

Заявка на міжнародний патент No.WO 94/25585

Заявка на міжнародний патент No.WO 94/29444

Заявка на міжнародний патент No.WO 95/01994

Заявка на міжнародний патент No.WO 95/03408

Заявка на міжнародний патент No.WO 95/24217

Заявка на міжнародний патент No.WO 95/33770

Заявка на міжнародний патент No.WO 96/14436

Заявка на міжнародний патент No.WO 96/34096, опублікована 31 жовтня 1996р.

Заявка на міжнародний патент No.WO 97/13852

Заявка на міжнародний патент No.WO 97/20574

Заявка на міжнародний патент No.WO 97/38137

Заявка на міжнародний патент No.WO 98/24884

Заявка на міжнародний патент No.WO 98/24893, опублікована 11 червня 1998р.

Еквіваленти

У приведених вище описі і прикладах деталізуються деякі переважні здійснення винаходу і описуються найкращі з точки зору заявників способи. Потрібно розуміти, однак, що незалежно від того, як детально вищевикладене може виглядати в тексті, винахід може бути реалізований багатьма способами, і винахід потрібно тлумачити відповідно до прикладеної формули винаходу і будь-яких її еквівалентів.

Формула винаходу

1. Моноклональне антитіло людини, яке зв'язує антиген-4 цитотоксичного Т-лімфоциту (CTLA-4) або його антиген-зв'язуючий фрагмент, при цьому вказане антитіло або фрагмент інгібує зв'язування CTLA-4 і B7-2 з

IC₅₀, яка дорівнює приблизно 100 нМ або менше.

2. Антитіло або фрагмент за п. 1, де вказане антитіло або фрагмент інгібує зв'язування CTLA-4 людини й B7-1 з IC₅₀, яка дорівнює приблизно 100 нМ або менше, і інгібує зв'язування CTLA-4 людини й B7-2 з IC₅₀, яка дорівнює приблизно 100 нМ або менше, і де вказане антитіло має щонайменше одну з властивостей, вибрану з групи, що складається з:

- а) зв'язує CTLA-4 людини зі спорідненістю зв'язування приблизно 10⁻⁹ або більше;
- б) збільшує продукування цитокінів у тесті Т-клітин людини на 500 пг/мл або більше;
- в) збільшує продукування ІЛ-2 у тесті Т-клітин людини на 500 пг/мл або більше;
- г) збільшує продукування Г-інтерферону в тесті Т-клітин людини на 500 пг/мл або більше;
- д) не зв'язує CTLA-4 миші, щура і кролика;
- е) зв'язує CTLA-4 довгохвостих макак і макак-резус.

3. Антитіло або фрагмент за п. 1 або 2, де вказане антитіло інгібує зв'язування між CTLA-4 людини й B7-1 з IC₅₀, меншою ніж приблизно 50 нМ, і інгібує зв'язування між CTLA-4 людини й B7-2 з IC₅₀, меншою ніж приблизно 0,38 нМ.

4. Антитіло або фрагмент за п. 1, що включає амінокислотну послідовність легкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з:

- а) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена A27 v_L людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію;
- б) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена 012 v_L людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію;
- в) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена A10/A26 v_L людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію;
- г) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена A17 v_L людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію;
- д) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена A3/A19 v_L людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію.

5. Антитіло або фрагмент за п. 4, де вказана амінокислотна послідовність батьківської лінії гена A27 v_L людини містить щонайменше 1 мутацію, вибрану з групи, яка складається з:

- а) щонайменше однієї амінокислоти в CDR1, вилученої в порівнянні з амінокислотою послідовністю батьківської лінії гена A27 v_L людини;
- б) залишку серину, заміщеного в положенні 6 у батьківській лінії CDR3, показаній на Фіг. 4, гена A27 v_L людини;
- в) щонайменше одного консервативного або неконсервативного заміщення в CDR1 в порівнянні з амінокислотою послідовністю батьківської лінії гена A27 v_L людини.

6. Антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-5, що включає послідовність CDR1, CDR2 або CDR3 легкого ланцюга, показану на одній з Фігур 4-8.

7. Антитіло або фрагмент за п. 6, де послідовність CDR1, CDR2 або CDR3 легкого ланцюга вибирається з групи, яка складається з:

- а) амінокислотних послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 4.1.1, антитіла 4.8.1, антитіла 4.14.3, антитіла 6.1.1, антитіла 4.10.2 або антитіла 4.13.1, показаних на Фіг. 4;
- б) амінокислотних послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 3.1.1, антитіла 11.2.1, антитіла 11.6.1 або антитіла 11.7.1, показаних на Фіг. 5;
- в) амінокислотних послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 2.1.3, показаних на Фіг. 6;
- г) амінокислотних послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 12.3.1, показаних на Фіг. 7; і
- д) амінокислотних послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 12.9.1, показаних на Фіг. 8.

8. Антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-7, що включає амінокислотну послідовність легкого ланцюга, яка включає послідовність, вибрану з групи, що складається з амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO:14-26, 65, 67, 69 або 71.

9. Антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-8, що має важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність батьківської лінії гена V_H3-33 (DP-50) людини або вказану послідовність батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію.

10. Антитіло або фрагмент за п. 1, що включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з:

- а) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена V_H3-33 (DP-50) людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію;
- б) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена V_H4-33 (DP-65) людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію;
- в) амінокислотної послідовності батьківської лінії гена V_H (DP-47) людини або вказаної послідовності батьківської лінії, що містить щонайменше 1 мутацію.

11. Антитіло або фрагмент за пп. 1 або 9, що включає амінокислотну послідовність CDR1, CDR2 або CDR3 важкого ланцюга, представлених на фігурі 2.

12. Антитіло або фрагмент за п. 1, де важкий ланцюг включає амінокислотні послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла, представлені на фігурі 2.

13. Антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-12, що включає амінокислотну послідовність важкого

ланцюга, вибрану з групи, яка складається з амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO:1-8, 10-13, 63, 66, 68 або 70.

14. Антитіло або фрагмент за п. 1, де вказане антитіло або фрагмент вибраний із групи, яка складається з:

а) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну ділянку амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:63, і додатково включає амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:65;

б) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну ділянку амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:66, і додатково включає амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:67;

в) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну ділянку амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:68, і додатково включає амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:69; і

г) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну ділянку амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:70, і додатково включає амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:71.

15. Антитіло або фрагмент за п. 14, яке включає:

а) амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:63 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:65, де вказане антитіло не має сигнальних пептидів, представлених у вказаних послідовностях;

б) амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:66 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:67, де вказане антитіло не має сигнальних пептидів, представлених у вказаних послідовностях;

в) амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:68 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:69, де вказане антитіло не має сигнальних пептидів, представлених у вказаних послідовностях; і

г) амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:70 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:71, де вказане антитіло не має сигнальних пептидів, представлених у вказаних послідовностях.

16. Антитіло або фрагмент за п. 1, що виявляє одну або більше властивостей, вибраних із групи, яка складається з:

а) конкурентно інгібувати зв'язування CTLA-4 з антитілом за п.14 або 15;

б) зв'язувати такий же епітоп, як і антитіло за п.14 або 15; і

в) мати специфічність зв'язування по суті таку ж, як і в антитіла за п.14 або 15.

17. Антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-3, що включає щонайменше одне з наступних:

а) послідовності FR1, FR2 і FR3 людини, які кодуються сімейством генів людини V_H 3-33 або вказаним сімейством генів з консервативними замінами, одиничною неконсервативною заміною або з обома; або

б) послідовності FR1, FR2 і FR3 людини, які кодуються сімейством генів людини V_K A27 або вказаним сімейством генів з консервативними замінами, одиничною неконсервативною заміною або з обома.

18. Антитіло за п. 1, що включає варіабельну частину амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:70 і додатково включає амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:71.

19. Антитіло або фрагмент за п. 1, вибране з групи, яка складається з:

а) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну частину амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:3, і амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:16;

б) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну частину амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:8, і амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:21;

в) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну частину амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:4, і амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:17; і

г) антитіла або фрагмента, що включає варіабельну частину амінокислотної послідовності важкого ланцюга, представлену у SEQ ID NO:1, і амінокислотну послідовність варіабельної частини легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:14.

20. Антитіло або фрагмент за п. 1, вибране з групи, яка складається з:

а) амінокислотної послідовності важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:3, і амінокислотної послідовності легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 16;

б) амінокислотної послідовності важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:8, і амінокислотної послідовності легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 21;

в) амінокислотної послідовності важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:4 без сигнальної пептидної послідовності, й амінокислотної послідовності легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 17 без сигнальної пептидної послідовності;

г) амінокислотної послідовності важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:1 без сигнальної пептидної послідовності, й амінокислотної послідовності легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 14 без сигнальної пептидної послідовності.

21. Антитіло або фрагмент за п. 1, вибране з групи, яка складається з:

а) антитіла або фрагмента, що включають амінокислотну послідовність важкого ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 4.13.1, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність легкого

ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 4.13.1, показану на фігурі 4;

б) антитіла або фрагмента, що включають амінокислотну послідовність важкого ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 4.14.3, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність легкого ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 4.14.3, показану на фігурі 4; і

в) антитіла або фрагмента, що включають амінокислотну послідовність важкого ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 6.1.1, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність легкого ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 6.1.1, показану на фігурі 4.

22. Антитіло або фрагмент за п. 1, яке включає амінокислотну послідовність важкого ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 11.2.1, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність легкого ланцюга, що містить послідовність CDR1, CDR2 і CDR3 антитіла 11.2.1, показану на фігурі 5.

23. Антитіло або фрагмент за п. 1, вибране з групи, яка складається з:

а) антитіла або фрагмента, що включають амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 важкого ланцюга антитіла 4.13.1, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 легкого ланцюга антитіла 4.13.1, показану на фігурі 4;

б) антитіла або фрагмента, що включають амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 важкого ланцюга антитіла 4.14.3, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 легкого ланцюга антитіла 4.14.3, показану на фігурі 4;

в) антитіла або фрагмента, що включають амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 важкого ланцюга антитіла 6.1.1, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 легкого ланцюга антитіла 6.1.1, показану на фігурі 5.

24. Антитіло або фрагмент за п. 1, що включають амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 важкого ланцюга антитіла 11.2.1, показану на фігурі 2, і амінокислотну послідовність від CDR1 до CDR3 легкого ланцюга антитіла 11.2.1, показану на фігурі 5.

25. Антитіло або фрагмент за п. 1, які включають амінокислотну послідовність важкого ланцюга, що містить амінокислотні залишки 1-89 послідовності SEQ ID NO:9, і додатково включають амінокислотну послідовність легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:22.

26. Фармацевтична композиція, яка використовується при лікуванні раку, запалення або аутоімунного захворювання, що включає антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-25 і фармацевтично прийнятний носій.

27. Лінія клітин, що продукує антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-25.

28. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує важкий і/або легкий ланцюг антитіла або фрагмента за будь-яким з пп. 1-25.

29. Виділена нуклеїнова кислота за п. 28, операційно зв'язана з послідовністю, що керує експресією.

30. Спосіб одержання трансгенного ссавця, що не є людиною, або рослини, що включає стадію введення виділеної нуклеїнової кислоти за п. 28 або 29 в плюрипотентну клітину ссавця, що не є людиною, або рослини, де вказаний трансгенний ссавець або рослина експресує вказану нуклеїнову кислоту.

31. Спосіб збільшення продукування IL-2 або IFN-Г у Т-клітинах пацієнта, що включає стадію введення пацієнту антитіла або фрагмента за будь-яким з пп. 1-25 або фармацевтичної композиції за п. 26.

32. Спосіб збільшення цитотоксичної відповіді Т-клітин пацієнта, що включає стадію введення пацієнту антитіла або фрагмента за будь-яким з пп. 1-25 або фармацевтичної композиції за п. 26.

33. Спосіб за п. 32, при якому вказане антитіло або фрагмент не опосередковують комплементзалежну цитотоксичність.

34. Спосіб лікування пухлини у пацієнта, що включає стадії введення пацієнту комбінації, що включає антитіло або фрагмент за будь-яким з пп. 1-25 або фармацевтичну композицію за п. 26, і клітин, які експресують колонієстимулюючий фактор гранулоцитів-макрофагів.

Фірыпа 1

Фірыпа 1A

ДНК важкого ланцюга :1.1

ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GGTTTTCTCTC	GTTCCTCTTT	TAAGAGGTGT	50
CCAGTGTGAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG	100
GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGTAGCGT	CTGGATTGAC	CTTCAGTAGC	150
CATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT	200
GGCAGTTATA	TGGTATGATG	GAAGAAATAA	ATACTATGCA	GACTCCGTGA	250
AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTTCCTG	300
CAAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG	350
AGGAGGTCAC	TTGGGTCTTT	TTGACTACTG	GGGCCAGGGA	ACCTGTGTCA	400
CCGTCTCTCT	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCGCCC	450
TGCTCCAGGA	GCACCTCCGA	GAGCACAGCG	GGCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	500
GGACTACTTC	CCCGAACC GG	TGACGGTGTG	GTGGAACTCA	GGCGCTCTGA	550
CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCAGCTGTCC	TACAGTCTCT	AGGACTCTAC	600
TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAACTTCG	GCACCCAGAC	650
CTACACCTGC	AACGTAGATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA	700
CAGTTGAGCG	CAAAATGTTGT	GTGGAGTGCC	CACCGTGCCC	AGCACCACCT	750
GTGGCAGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	CCAAAACCCA	AGGACACCTT	800
CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACGTG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC	850
ACGAAGACCC	CGAGGTCCAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG	900
CATAATGCCA	AGACAAAGCC	ACGGGAGGAG	CAGTTCAACA	GCACGTTCCG	950
TGTGGTCAGC	GTCTCACC GG	TTGTGCACCA	GGACTGGCTG	AACGGCAAGG	1000
AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA	1050
ACCATCTCCA	AAACCAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCAAGG	TGTACACCTT	1100
GGCCCCATCC	CGGGAGGAGA	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC	1150
TGGTCAAAGG	CTTCTACCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT	1200
GGGCAGCCGG	AGAACAATA	CAAGACCACA	CCTCCCATGC	TGGACTCCGA	1250
CGGCTCTTTC	TTCTCTTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC	1300
AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC	1350
CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CCGGGTAAAT	GA	1392

(SEQ ID NO:27)

Білок важкого ланцюга

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRLRLS	CVASGPTFSS	50
HGMHWVRQAP	GKGLEWVAVI	WYDGRNKYYA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLFL	100
QMNSLRAEDT	AVYYCARGGH	FGPFDYWGQG	TLVTVSSAST	KGPSVFPLAP	150
CSRSTSESTA	ALGCLVKDYF	PEFVTVSWNS	GALTSKVHTF	PAVLQSSGLY	200
SLSSVVTGPS	SNFGTQTYTC	NVDHKPSNTK	VDKTVKRCCK	VECPPCPAPP	250
VAGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVQ	FNWYVDGVEV	300
ENAKTKPREE	QFNSTFRVVS	VLTVVHQDWL	NGKEYKCKVS	NKGLPAPIEK	350
TISKTKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDLAVENESN	400
GQPENNYKTT	PFMLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQOGNVFS	CSVMHEALHN	450
HYTQKLSLS	PGK				463

(SEQ ID NO:1)

Фигура 1 А (продолжение)

ДНК-матрица (продолжение)

ATGGAAGCTC	CAAGGAGCT	TCTTCTCTC	CTGCTACTCT	CTCTTCCAGA	50
TACCACTGGA	GAATTTGTGT	TCACCACTCT	TCTAGGACCT	CTCTCTTTGT	100
CTCAAGGCTT	AAGAGGCAAC	CTCTCTCTCA	GGGCACTCT	GAGTATTAGC	150
AGGAGCTTTT	TAGCTCTGTA	CAATCAGAGA	CTCTGCTAGG	CTCTCAGCTT	200
CTCTATCTAT	CTCTCAGTCA	CCAGGCTCAC	TGCTCTCTCA	GACAGCTTCA	250
CTGCTCTGTC	CTCTGCTGGA	GACTTCACTC	TGCTCTCTCA	CAGCTCTGAG	300
CTCTGAGATT	TTTCACTGTA	TGCTCTCTCA	CTCTCTCTCA	CTCTCTCTCA	350
GACTTCTGTC	CAAGGCTGCA	AGCTCTCTAT	CAAGGCTGCA	CTCTCTCTCA	400
CACTCTCTCT	CATCTCTGTC	CACTCTCTAT	AGCTCTCTCA	ATCTCTCTCA	450
CTCTCTCTCT	TGCTCTCTCT	CACTCTCTCT	ATCTCTCTCA	AGCTCTCTCA	500
ATCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	550
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	600
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	650
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	700
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	750

(SEQ ID NO: 45)

ДНК-матрица (продолжение)

ATGGAAGCTC	CAAGGAGCT	TCTTCTCTC	CTGCTACTCT	CTCTTCCAGA	50
TACCACTGGA	GAATTTGTGT	TCACCACTCT	TCTAGGACCT	CTCTCTTTGT	100
CTCAAGGCTT	AAGAGGCAAC	CTCTCTCTCA	GGGCACTCT	GAGTATTAGC	150
AGGAGCTTTT	TAGCTCTGTA	CAATCAGAGA	CTCTGCTAGG	CTCTCAGCTT	200
CTCTATCTAT	CTCTCAGTCA	CCAGGCTCAC	TGCTCTCTCA	GACAGCTTCA	250
CTGCTCTGTC	CTCTGCTGGA	GACTTCACTC	TGCTCTCTCA	CAGCTCTGAG	300
CTCTGAGATT	TTTCACTGTA	TGCTCTCTCA	CTCTCTCTCA	CTCTCTCTCA	350
GACTTCTGTC	CAAGGCTGCA	AGCTCTCTAT	CAAGGCTGCA	CTCTCTCTCA	400
CACTCTCTCT	CATCTCTGTC	CACTCTCTAT	AGCTCTCTCA	ATCTCTCTCA	450
CTCTCTCTCT	TGCTCTCTCT	CACTCTCTCT	ATCTCTCTCA	AGCTCTCTCA	500
ATCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	550
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	600
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	650
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	700
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	750

(SEQ ID NO: 46)

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Фірыпа І

Фірыпа ІВ

ДНК важкого ланцюга 4.8.1

ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GGTTTTCTC	GTTCCTCTTT	TAAGAGGTGT	50
CCAGTGTGAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG	100
GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTACAGCGT	CTGGATTAC	CTTCAGTAAC	150
TATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT	200
GGCAGTTATA	TGGTATGATG	GAAGTAATAA	ACACTATGGA	GACTCCGTGA	250
AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGTGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG	300
CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG	350
AGGAGAGAGA	CTGGGGTCTT	ACTTTGACTA	CTGGGGCCAG	GGAAACCCTGG	400
TCACCGTCTC	CTCAGCCTCC	ACCAAGGGCC	CATCGGTCTT	CCCCCTGGCG	450
CCCTGTCTCA	GGAGCACCTC	CGAGAGCACA	GCGGCCCTGG	GCTGCCTGGT	500
CAAGGACTAC	TTCCCCGAAC	CGGTGACGGT	GTCTGTGAAC	TCAGGCGCTC	550
TGACCAGCGG	CGTGACACCC	TTCCAGCTG	TCCTACAGTC	CTCAGGACTC	600
TACTCCCTCA	GCAGCGTGGT	GACCGTGCCC	TCCAGCAACT	TCGGCACCCA	650
GACCTACACC	TGCAACGTAG	ATCACAAGCC	CAGCAACACC	AAGGTGGACA	700
AGACAGTTGA	GCGCAAATGT	TGTGTGAGT	GCCCACCGTG	CCCAGCACCA	750
CCTGTGGCAG	GACCGTCAGT	CTTCCTCTTC	CCCCCAAAC	CCAAGGACAC	800
CCTCATGATC	TCCCGGACCC	CTGAGGTCAC	GTGCGTGGTG	GTGGACGTGA	850
GCCACGAAGA	CCCCGAGGTC	CAGTTCAACT	GGTACGTGGA	CGGCGTGGAG	900
GTGCATAATG	CCAAGACAAA	GCCACGGGAG	GAGCAGTTCA	ACAGCACGTT	950
CCGTGTGGTC	AGCGTCTCTA	CCGTTGTGCA	CCAGGACTGG	CTGAACGGCA	1000
AGGAGTACAA	GTGCAAGGTC	TCCAACAAAG	GCCTCCCAGC	CCCCATCGAG	1050
AAAACCATCT	CCAAAACCAA	AGGGCAGCCC	CGAGAACCAC	AGGTGTACAC	1100
CCTGCCCCCA	TCCCGGGAGG	AGATGACCAA	GAACCAGGTC	AGCCTGACCT	1150
GCCTGGTCAA	AGGCTTCTAC	CCCAGCGACA	TGCGCGTGGA	GTGGGAGAGC	1200
AATGGGCAGC	CGGAGAACAA	CTACAAGACC	ACACCTCCCA	TGCTGGACTC	1250
CGACGGCTCC	TTCTTCTCTT	ACAGCAAGCT	CACCGTGGAC	AAGAGCAGGT	1300
GGCAGCAGGG	GAACGTCTTC	TCATGCTCCG	TGATGCATGA	GGCTCTGCAC	1350
AACCACTACA	CGCAGAAGAG	CCTCTCCCTG	TCTCCGGGTA	AATGA	1395

(SEQ ID NO:28)

Блок важкого ланцюга 4.8.1

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCC	VOLVESGGGV	VQGRSLRLS	CTASGFTFSN	50
YGMHWVRQAP	GKGLEWVAVI	WYDGSNKHYG	DSVKGRFTIS	SDNSKNTLYL	100
QMNSLRAEDT	AVYYCARGER	LGSYFDYWGO	GTILVTSSAS	TKGPSVFPLA	150
PCSRSTSEST	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVET	PPAVLQSSGL	200
YSLSSVVTVP	SSNFGTQTYT	CNVDRHPSNT	KVDKTVKRC	CVECPFCPAP	250
PVAGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	QFNWYVDGVE	300
VHNAKTKPRE	EQFNSTFRVV	SVLTVVHQDW	LNGKEYKCKV	SNKGLPAPIE	350
KTIKTKGQP	REPQVYTLPP	SREEMTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	400
NGQPENNYKT	TPPMLDSGGS	FFLYSKLTVD	KSRWQOGNVF	SCSVMEALH	500
NHYTQKSLSL	SPGX				514

(SEQ ID NO:2)

Phyva 1

Phyva 1B (unclassified)

Phyva 1B (unclassified)

ATGGAACCC	CAGGCGGCG	TCTCTTCTC	CTGCTACTT	GGCTGCCCA	50
TACCACTCA	GAAATTCTT	TGAGCCAGT	TCCAGCCAG	CTGCTCTGT	100
CTCAGAGCA	AAGAGCCAG	CTCTCTCTC	GAATCACTT	TAGCAGCAG	150
ATCTTACCT	CTTACGACG	GAAAGCTTC	EAGGCTCCA	GGCTTCTCT	200
CTATGCTCA	TCCAGCAGG	CACTGCTCT	TCAGAGAGG	TTCACTGCA	250
GTGGTCTTG	GAGAGACTT	ACTCTACCA	TCCAGCAGT	GGAGCTTAA	300
GAATTTGCA	TCTATTACT	TGAGCAGAT	GGATCTCTC	CTTCACTTT	350
CGGCGAGAG	AGCAGCTTC	AGATCAGCC	AATCTGCTC	GCAGCTCTG	400
TCCTGCTCT	CGGCTCTCT	GTGAGCAGT	TGAATCTTC	AATCTGCTT	450
GTCTGCTCT	TGCTTACTA	CTTCTCTCT	AGAGAGGCA	AATCTGCTT	500
CAAGCTGAT	AAGCTCTCT	ATCTGCTTA	CTCTGAGAG	AGTCTCTCT	550
AGAGGAGAG	CAAGCAGAG	AGCTAGCTC	TGAGAGGAG	CTTCTGCTT	600
AGCAGAGAG	ATCAGAGAG	ATCAGAGCT	TAGCTCTCT	AATCTGCTT	650
TCAGGCTCT	AGCTGCTCT	TGAGAGAG	CTTCTGAGG	GGAGCTCTT	700
AG					750

[SEQ ID NO: 41]

Phyva 1B (unclassified)

ATGGAACCC	CAGGCGGCG	TCTCTTCTC	CTGCTACTT	GGCTGCCCA	50
TACCACTCA	GAAATTCTT	TGAGCCAGT	TCCAGCCAG	CTGCTCTGT	100
CTCAGAGCA	AAGAGCCAG	CTCTCTCTC	GAATCACTT	TAGCAGCAG	150
ATCTTACCT	CTTACGACG	GAAAGCTTC	EAGGCTCCA	GGCTTCTCT	200
CTATGCTCA	TCCAGCAGG	CACTGCTCT	TCAGAGAGG	TTCACTGCA	250
GTGGTCTTG	GAGAGACTT	ACTCTACCA	TCCAGCAGT	GGAGCTTAA	300
GAATTTGCA	TCTATTACT	TGAGCAGAT	GGATCTCTC	CTTCACTTT	350
CGGCGAGAG	AGCAGCTTC	AGATCAGCC	AATCTGCTC	GCAGCTCTG	400
TCCTGCTCT	CGGCTCTCT	GTGAGCAGT	TGAATCTTC	AATCTGCTT	450
GTCTGCTCT	TGCTTACTA	CTTCTCTCT	AGAGAGGCA	AATCTGCTT	500
CAAGCTGAT	AAGCTCTCT	ATCTGCTTA	CTCTGAGAG	AGTCTCTCT	550
AGAGGAGAG	CAAGCAGAG	AGCTAGCTC	TGAGAGGAG	CTTCTGCTT	600
AGCAGAGAG	ATCAGAGAG	ATCAGAGCT	TAGCTCTCT	AATCTGCTT	650
TCAGGCTCT	AGCTGCTCT	TGAGAGAG	CTTCTGAGG	GGAGCTCTT	700
AG					750

[SEQ ID NO: 45]

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Onyda 1

Onyda 1C

ДНК мушкетера 4 | 4.1

CTTGGGAGGT	CCCTCAGAGT	CTCCTCTGCA	GGCTCTGAT	TCACCTTCAG	50
TATTCATGAC	ATTCATGAG	TCCGCTAGGC	TCAGGCGAG	GGCTCTGAT	100
GGCTGGCAGT	TATTCATGAT	GATGCGAGCA	ATAAGACTTA	GGCTCTGAT	150
CTGAGAGGCT	CTTCAGAGT	CTCCAGAGAT	ATTTCAGAGA	AGAGGCTGTA	200
TTTCAGAGAT	ATTCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	ATTTCAGAGA	250
CTTCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	ATTTCAGAGA	300
CTTCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	ATTTCAGAGA	350
CTTCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	ATTTCAGAGA	400
CTTCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	ATTTCAGAGA	450
CTTCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	CTCCAGAGAT	ATTTCAGAGA	480

[SEQ ID NO:29]

Black Eagle genome 4 | 4.3

ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	50
ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	100
ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	150
ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	ATGATGATGAT	200

[SEQ ID NO:3]

ДНК мушкетера 6 | 6.3

CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	50
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	100
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	150
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	200
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	250
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	300
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	350
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	400
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	450
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	480

[SEQ ID NO:42]

Black Eagle genome 4 | 4.3

CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	50
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	100
CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	CTTCAGAGAT	150

[SEQ ID NO:16]

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Фірыпа 1

Фірыпа 1D

ДНК важкого ланцюга 6.1.1

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTCCTCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT 50
 CCAGTGTCTAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCGAGCCTG 100
 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTACAGCGT CTGGATTAC CTTCAGTAGT 150
 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT 200
 GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGCAATAA ACACTATGCA GACTCCGCGA 250
 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG 300
 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG 350
 AGCCGGACTG CTGGGTTACT TTGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA 400
 CCGTCTCCTC AGCCTCCACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCGCCC 450
 TGCTCCAGGA GCACCTCCGA GAGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA 500
 GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAAGTCA GGCGCTCTGA 550
 CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCAGCTGTCC TACAGTCTTC AGGACTCTAC 600
 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAACTTCG GCACCCAGAC 650
 CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA 700
 CAGTTGAGCG CAAATGTTGT GTCGAGTGCC CACCGTGCCC AGCACCACCT 750
 GTGGCAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT 800
 CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC 850
 ACGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG 900
 CATAATGCCA AGACAAAGCC ACGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTTCCG 950
 TGTGGTCAGC GTCTCACC GGTGTCACCA GGAAGTGGTG AACGGCAAGG 1000
 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCAGCCCC CATCGAGAAA 1050
 ACCATCTCCA AAACCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCTT 1100
 GCCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGAGC CTGACCTGCC 1150
 TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT 1200
 GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACA CCTCCCATGC TGGACTCCGA 1250
 CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC 1300
 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC 1350
 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAT GA 1392

(SEQ ID NO:30)

Блок важкого ланцюга 6.1.1

MEFGLEWVFL VALLRGVQCQ VOLVESGGGV VEPGRSLRLS CTASGFTFES 50
 YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNKHYA DSAKGRFTIS RDNSKNTLYL 100
 QMNSLRAEDT AVYYCARAGL LGYFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP 150
 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY 200
 SLSSVVTGPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP 250
 VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV 300
 HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHODWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK 350
 TISKIKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN 400
 GQPENNYKTT PPMLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN 450
 HVTQKSLSLG PGK 463

(SEQ ID NO:4)

Фигура 1

Фигура 1D (продолжение)

Block name: figura 6.1.1

ATGGAAGCTT	CAGGCGAGCT	TGCTTCTCTC	CTGCTACTCT	GGTTCGGAGC	50
TACGACGGGA	GAAATTTTCT	TGACCGAGTC	TGCAGGCAAC	CTGCTCTTCT	100
CTGAGGGGA	AAGAGCGGCG	CTCTCTCTTA	GGGCGAGTCA	AGCTCTTACG	150
AGCTACTTAT	CTCTGTACCA	ACGAAAGCT	GCGAGGCTTC	CGAGGCGCTT	200
CATCTATGCT	GTATGACGCA	GGGCGAGTTC	CATCGAGAGC	AGCTTCACTG	250
GGATGCGGTC	TGGGACAGAC	TTTCTCTCTA	CGATCGGAGC	ACTTCAGGCT	300
GAGATTTTTC	CATGTATTA	CTCTCTCTAC	TATGCTATCT	CAGCTTTCAC	350
TTTCTCTCTT	GGGAGCGAAG	TGCTATCTCA	ACGACTCTTC	GTTCGAGCTT	400
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	TCTGATGAGC	AGTTGAAATC	TGCTACTCTC	450
TCTCTCTCTT	GGTTCGAGCA	TATCTCTCTT	CGAGGAGGAG	CGAAAGTACA	500
GTGAAAGTTC	GATTAAGGCG	TGCTATCTCT	TACTCTCTCT	GAGCTCTCTA	550
CATGAGGAGCA	CTGCAAGGCA	AGCTCTCTCT	GGTTCAGGAG	CAGCTCTCTA	600
CTGAGGAGCA	CAGCTCTCTA	GTATCTCTCT	GTCTCTCTCT	GGGATCTCTA	650
GGTCTCTCTC	CTGCTCTCTC	GGTCTCTCTA	GAGCTCTCTA	AGGCTCTCTT	700
CTCTCTCT					750

(SEQ ID NO: 43)

Block name: figura 6.1.1

ATGGAAGCTT	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	50
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	100
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	150
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	200
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	250
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	300
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	350
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	400
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	450
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	500
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	550
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	600
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	650
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	700
CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	CTGCTCTCTC	750

(SEQ ID NO: 17)

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

PLEASE USE

CGCGGCGGTC	AGCGGCGGTC	GTGCGGCGTC	CTGCGGCGTC	CGCGGCGGTC	50
ATTGCGGCGTC	AGTACGCGTC	GCATGCGGTC	GCTGCGGCGTC	GCTGCGGCGTC	100
AGCGGCGGTC	GTGCGGCGTC	GTGCGGCGTC	AGTACGCGTC	TAATGCGGTC	150
TATGCGGCGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	AGTACGCGTC	AGTACGCGTC	200
CGCGGCGGTC	TATGCGGCGTC	TATGCGGCGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	250
GTGCGGCGTC	GTGCGGCGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	300
TATGCGGCGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	350
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	400
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	450
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	500
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	550
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	600
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	650
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	700
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	750
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	800
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	850
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	900
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	950
CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	CGCGGCGGTC	1000

Abstract

DVYSPKSLR	LQCHAGTIS	SEYOMSVVD	XPKHLEVA	VTHUGENCV	58
UDSWGCKRT	ESNDNGMEL	ZLGMNLSAL	GNAVTCANG	NALITFNNNY	199
WOCNTYTVS	SASTADPMT	PAPCSNSIA	RSDIALACL	INTPEFTCY	250
UNSGATIES	UNTTPAVLA				368

1992-1993

[illegible]

AACTCTCCAA	ACTCCCTCTT	TGAACTGTA	GCAGACGAG	TGCGATCAC	80
TTCCGCGCCA	AGTCAGAGCA	TTACACGTA	TTTATTTTC	TATGAGAGA	100
AACCGCGGA	ATCCCTAAC	TTCTGCTT	CTCGACATC	CACTTTCGA	150
AGTCGCTCT	CTTAAAGTT	CGTGGCTG	GGCTCTGGG	CAATTTCAC	200
TTTTCGCTG	AACGCTCTC	ATCTGAAGA	TTTTCACCT	TACTACTGTC	250
AACACACTG	CAGTCTGCA	TGACCTTTC	GGCTGGGAC	CAAGTTGAT	300
ATGAAACGA	CTGTGGGCG	ACCACTTTC	TTTATCTTC	CGCATCTGA	350
TGACGCTTC	AACTTCGAA	CTGCTCTCT	AGATTCCTT	CTGAAACTT	400
TTTATCCGAC	AGCGGCGA	CTTCTGCTG	AGCTGATA	CGCTCTCAA	450
TCGCTTAA					450

【参考文献】

Box 100, Denver, CO 80202-1000

OSRASHLASH	QSRVUTOSA	SURCHWELAN	XOORWELAKH	FILSATELLA	ED
SOUPPERFROG	QASTNPTION	NSALBERTAT	THGOORYSTC	PUNRGSHON	DD
LKOTUAPPSY	ELETPEROL	KDOTALSVCL	EMNYTPEAK	VOKWODAGLS	LD
89					52

12-00000

U A 7 6 9 3 6 C 2

Outline

AGCGTGGGCG	AGCGTGGGAG	GTCCCTGAGA	CTCTCTCTTG	TAGCGTCTGG	50
ATTGATCTAG	AGTAACTAGT	GGATACGCTG	GTTCGCGCAG	GCTCGAGGCA	100
AGGAGGCTGA	GTGGGTGGGA	GTTATATGCT	ATGATGGAAG	AAATAAGGAC	150
TATGCGAGAT	CGGTGAAGGG	GGATTCAGCT	ATCGGAGAGG	AGAAATCGAA	200
GAACAGCTTG	TATTTGCGAA	TGAACAGGCT	GAGGCGGGAG	GACAGCGGTC	250
TTATATTATG	TGGGAGAGTG	GGCCAGCTGG	GGCACTTTAG	CTACTGCGGC	300
CAAGGAACTT	TGTTGAGGCT	CTCTTCAGCT	TCTAGGAGAG	GTCTATCGGT	350
CTTACGCTTG	GGCGCTGCTT	CGAGGAGTAC	CTCGAGAGAG	ACAGGAGCGG	400
TGGGCGGCTT	GATGAAGGAC	TACTTCCGCG	AAGCGGAGAG	GTCGATCTGG	450
AACTGAGGCG	GTGTGAGGCG	GGGCTGAGAT	ACCTTCCGAG	CTTCTCTTCA	500
					501

(b) (5) DPP, (b) (5) ACP

QINDPORSIA	ISCVASOFTT	EMHSHVRO	APRQLEIVA	VYHIDANKO	50
YADSVRSFTT	ISADMSOVL	ELQMSAMM	ITATYICREY	AMGLDPTNS	100
QNTIVYSSA	ETKSPVTFE	AKCRLSEL	KAAQOITKD	TPPRVUSH	150
REGALTEGVB	TYAVLQ				167

(1982-11-10)

TEPCOAGGE	CECTEETATE	CTETECAGGE	GAAGAGGCA	CECTEECTTG	50
CAAGGCAAGT	CAAGGAGATA	CAAGGAGATA	CTEAGGCTEE	TAGAGGAGAA	100
AGCTGAGCA	GGCTGAGAG	CGCTEATCT	AGCTGAGAT	CTAGAGGAG	150
ACTGAGATC	CAGAGAGTT	CAGAGAGAT	GGCTGAGCA	CAGAGTTC	200
CTGAGAGTC	AGAGAGAGG	AGCTGAGAG	TTTTCAGTA	TATAGAGTC	250
AGAGAGAGG	TAGAGAGCA	TAGAGTTC	GGCTGAGAT	CAAGGAGAT	300
ATGAGAGTA	CTGAGAGAT	AGAGAGAT	TTTTCAGTA	GGCTGAGAT	350
TAGAGATTC	AGAGAGAGTA	CTGAGATCT	TTTTCAGTTC	CTGAGAGAT	400
TTTTCAGTC	AGAGAGAGTA	CTGAGAT			425

1322 IR 12-13

SPOTBLSBS	KRATLSCRAB	QSLSTNLAN	YOCKSCAPE	LLYRPSARA	30
TGIFDSFGE	GGNTDTLTI	BRLEPDEPAI	TYEDDYGTSP	PTFGFGUKYO	100
DEMTVAPTY	PIFFPSDEOL	KACTASVCL	LNUTYPRAX	VO	142

(REF ID: A63515)

U A 7 6 9 3 6 C 2

Clayton K.

TGGGCTGAG	GACTGTTGA	GGTTCAGC	ATGCTGCCC	TGAGCGCA	50
TGCTGTGGT	GGCTGATCA	GGAGTGGC	TGCTACTGC	AGCTGCTCC	100
GGGAGCAGC	AGGGAGGCG	CTGGACTGA	TTGGTACAT	CTATTACAT	150
GGGACAGCT	ACTACAGCC	GTCCCTCAG	AGTGGCTTA	GGATATCAT	200
AGACATCTT	TAGAACCAT	TGTCAGTGA	CTTGAGCTT	GTGACTGGG	250
GTGACAGGC	GGTGTATAT	TGTCCAGAG	ATAGTGGGA	CTACTACCT	300
ATGACCTCT	GGGGCAGCG	GACCACTTC	AGCTTCTCT	CAGCTTCCT	350
CAAGGCGCA	TGCTGTCTT	AGTTGTCCT	CTGCTCCCG	AGCACTCCG	400
AGGACAGCG	CGCCTCTGC	TGCTGTGCA	AGGACTACT	CGCGAAGCG	450
CTACAGCTT	CTTGGAGAT	AGGCGCTTC	AGGAGGCGG	TGCACAGCT	500
CGGCGCTTC	CTGCA				516

EXPOSURE DATA

SGPGLVTPSQ	ILSLCTVSG	GSLSGGFW	SWIKRPRKS	LEWIGYVYI	58
GRTYVNSLK	SHVETSGVE	ENGFELKST	VTAADTVYI	CARDSDPYG	100
IDVNDGGTV	IVERRATGP	SVPLAPSK	STSESTANLG	CLVADYFEP	150
LVVNNRDL	TSQVETRAY	EQ			172

車水 馬車 火車 電車 219

TTCTGGAGAGCT	TTCTGTCGCT	GACTGCGAAG	AGAGAACTGA	CGATCAGCTG	10
CCCGGCCCAAT	CAGAGCATTG	CTAGTAGCTT	ACATGCGTAT	CGACGGAAG	100
TAAATCACTT	TCGAAAGCTC	CTCATGAGCT	ATGCTTCCGA	GGAGTTCTCT	150
GGGTGCGCT	CGAGTTTCA	TGGCACTGG	TCTGGGAGAG	ATTTCAGCCG	200
GACCATCATT	AGCTTGGAG	CTGAGATGC	TGCAAGCTAT	TACGTCATG	250
AGAGTAGTAG	TTTACGGCTC	AGTTTCGGG	CAGGACCA	GGTGGAGATC	300
AGAGGAAGTG	TGGCTGCACT	ATCTGCTTTC	ATCTGCGGCG	CATCGATGAG	350
GGCTTTGAGA	TCTGGAGATG	GGTGTGTTAT	TTGCTGCTGT	ATTACCTTCT	400
ATGCCAGAGA	GACCAAGTA	GATGGAAGG	TGGATGAGG	CTCGACTGG	450
GTATCTCTCG	AGAG				465

Finda Kana Rarua 2.1.3

SRGQSVTPK	KAVTILRRAS	SGTGRSLHWI	QCKPDOSPKL	LTPVAPGSPS	10
GVRRERDGH	SGTDPELTIN	SGMADRAAY	YGRSSSLAPL	TPGGTKVSL	100
KETVAAPVE	IFPDEBQLK	SGTASVVELL	NNIYPRKATV	QNVFVNLQSL	150
ENDE					155

1520 23 10 20

-53-

Олупа I

Олупа II

ДНК-анализ образца 4.13.1

CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	50
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	100
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	150
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	200
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	250
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	300
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	350
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	400
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	450
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	500

(SEQ ID NO: 34)

ДНК-анализ образца 4.13.1

CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	50
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	100
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	150
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	200

(SEQ ID NO: 4)

ДНК-анализ образца 4.13.1

CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	50
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	100
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	150
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	200
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	250
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	300
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	350
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	400
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	450

(SEQ ID NO: 17)

ДНК-анализ образца 4.13.1

CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	50
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	100
CCAGGAGAGT	CCCTGAGAGT	CTGCTGAGAGT	CCCTCTGAGT	CCAGGAGAGT	150

(SEQ ID NO: 21)

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Abstract

GGCTTCGCTC	AGCTTGGGAG	GTCTCTGAGA	CTCTCGCTTC	CAAGCTCTCG	50
ATTACGCTTC	ATTACGCTATG	GCATGCACTG	GGTCCGCGCG	GTCTCGAGCA	100
AGGCGCTGGA	GTGGGTGGCA	GTATATAGCT	ATCATGGAAG	TGATGATAC	150
TATTCAGACT	CGCTGAGGCG	CGATTCGCG	ATCTCGAGAG	ACCAATTCAA	200
GATCAGCTG	TATCTGCAAG	TGACAGCT	GAGGCGCGAG	GACACGCTG	250
TGTATTACTG	TGCGTGGGAT	CGGAGCGGAG	CTACGCTTCA	CTACTACTAC	300
TACCGTTCG	AGCTTGGGCG	CGAGGCACT	AGCTGAGCG	TCTCTGAGG	350
CTCATCAAG	GGCGCATCG	TCTTCGCGT	CGCGCTTCG	TGCAGGACA	400
CTTCGCGGAG	ATCAGCGGCG	CTCGGCTGCG	TGCTCAAGGA	CTATTTCGCG	450
GAACCGCTCA	CGCTGTCTG	CAATTCAGCG	CTCTGAGCA	GGCGCTGCA	500
CAG					502

БЛОН ВЕНКОС ДА ИМАТА 1:2:1

TVTVQGRFLR	LSRAASGPTF	SSYGMWVQ	APFKGLEWPR	VTHYGGSNKY	90
YADSVNGRFT	ISRDNSMNTL	VLQWGLRAE	DTAVTYCARD	PRMAYLYLRY	100
NRQVVRQNT	TVTVSSATIR	QPSVPLAPE	SRSTSSDRAA	EGCLVKNYTF	136
EPYTVSNRAC	ALQGVH				

11K KANA KANJON 1121

CGCTGCTGCG	AGTGTGATC	GTATAGAGAC	AGGCTGACCA	TGCTTTGTCG	50
CGCAATGAC	AGCATTAACA	GTAATTTAGC	TTGCTATGAC	CAAGAACACG	100
CGAAGCCGC	TAAAGCTGGG	ATCTATCTCT	CATCCATTTT	CGAAGTGGG	150
CTCCGATCAZ	GGTTCAGTGG	CATGGGATCT	GGGACGATTT	TTACTCTGAC	200
CATGCGAGT	GTGCAACTTG	AACATTTTTC	AACTTACTAG	CTTCAACAGT	250
ATTACAGTAC	TCTATCTACT	TTGGTCTCTT	GGACCAAGAT	GGAAATCAGA	300
CGAACATGCG	CTGCGGCTTG	TTCTTTTATC	TTCTGGCCAT	CGATGAGGTA	350
GTGAAATCT	GGAACTGCTT	CTGTTGCTTG	CGTCTGCAAT	AAGTTCTATC	400
CGAAGGCGC	CAAGTA				417

1. Introduction

PEELSAVED	FVHTTIRASE	SINATLDWYC	OKPGRAPKIN	TYRASSLOSG	50
VSPRPSGOS	GOULTTIZSE	LOPEDFATY	COOYISTEPY	FURSTIVEIK	100
RTAAPSWE	EPSPSPOOLS	GIASVODLN	NPYTREAY		150

SEP 10 1964

-55-

Figure I

Figure II

DNK data sample 11.6.1

GGGCTGGTCC	AGCTCGGAG	GTCTCGAGA	CTCTCTCTG	CAGCTCTGG	50
ATTCAGCTTC	AGTAGCTATG	GCATGACTG	GGTCAGGCG	GTCTCAGTA	100
AGGCTCTGA	GTGGCTGGA	GTATATGCT	ATGATGCAAG	TCTATGATG	150
TATCCAGACT	CGGTGAGGG	GGATTCAGG	ATCTCAGAG	ACATTCGTA	200
GAACAGCTG	TATCTGAGA	TGACAGCTT	GGAGGCGAG	GAACGCTGG	250
TGATTAAGT	TGCGAGAGG	GTCTAGTGG	TATCAGCTG	TATGAGCTG	300
TGGGGCCAG	GGAGCAGCT	GGCTCTCTT	TGAGCTCTA	CTAGGCTGG	350
ATGCTCTTC	GGCTGCTGG	GGCTCTCTG	GAGCTCTTG	GAGAGCAGG	400
CGGCTCTGG	CTGCTCTCT	AGGCTCTCT	TGCGAGAGG	GTCTCAGCT	450
2					451

(SEQ ID NO:36)

DNK data sample 11.6.1

GGVGGGCTG	AGCAGCTTT	GGCTCTCTG	AGGCTCTCT	GTCTCAGCT	50
TAGCTCTCT	TGCTCTCTG	TGCTCTCTG	TGCTCTCTG	AGGCTCTCT	100
GGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	150
3					151

(SEQ ID NO:37)

DNK data sample 11.6.1

AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	50
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	100
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	150
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	200
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	250
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	300
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	350
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	400
AG					401

(SEQ ID NO:38)

DNK data sample 11.6.1

TGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	50
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	100
AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	AGCTCTCTG	150

(SEQ ID NO:39)

Фигура 1

Фигура 1X

ДНК-матрица (фигура 1.7.1)

CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	50
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	100
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	150
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	200
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	250
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	300
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	350
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	400
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	450

(SEC ID NO: 27)

ДНК-матрица (фигура 1.7.1)

CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	50
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	100
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	150

(SEC ID NO: 11)

ДНК-матрица (фигура 1.7.1)

CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	50
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	100
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	150
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	200
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	250
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	300
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	350
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	400
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	450
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	500

(SEC ID NO: 50)

ДНК-матрица (фигура 1.7.1)

CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	50
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	100
CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	CTGCTCCAGC	150

(SEC ID NO: 24)

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Определ

Фирма И.

ДНК-анализ (таблица 12.1.1)

TCCTCTGCGC	CGTCTGCGCT	CAGCTCTGCT	TACTATGCGC	
TCCTCTGCGC	CGTCTGCGCT	CAGCTCTGCT	TACTATGCGC	50
ACCTCTGCGC	TCCTCTGCGC	GTAGCTCTGCGC	CGTCTGCGCT	100
CTCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	TCTCTGCGCT	GTAGCTCTGCGC	150
ATCTCTGCGC	ATCTCTGCGC	CTCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	200
CTCTCTGCGC	ATCTCTGCGC	ATCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	250
ACCTCTGCGC	GTCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	300
CTCTCTGCGC	GTCTCTGCGC	CTCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	350
CTCTCTGCGC	ACCTCTGCGC	CTCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	400
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	450
CTCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CTCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	500
CTCTCTGCGC	CTCTCTGCGC	CTCTCTGCGC	CTCTCTGCGC	550

(SEQ ID NO: 11)

ДНК-анализ (таблица 12.1.1)

CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	50
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	100
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	150
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	200

(SEQ ID NO: 12)

ДНК-анализ (таблица 12.1.1)

CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	50
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	100
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	150
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	200
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	250
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	300
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	350
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	400
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	450

(SEQ ID NO: 13)

ДНК-анализ (таблица 12.1.1)

CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	50
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	100
CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	CGCTCTGCGC	150

(SEQ ID NO: 14)

Файл I

Файл IM

Вектор номера 12911

ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	50
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	100
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	150
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	200
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	250
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	300
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	350
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	400
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	450
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	490

(SEQ ID NO:13)

Вектор номера 12912

VOPERSLRLS	CRASGCTFAN	TAMHVRCAT	GRULEGVVVI	WEGGANKYIA	50
VOPERSLRLS	CRASGCTFAN	TAMHVRCAT	GRULEGVVVI	WEGGANKYIA	100
VOPERSLRLS	CRASGCTFAN	TAMHVRCAT	GRULEGVVVI	WEGGANKYIA	150
VOPERSLRLS	CRASGCTFAN	TAMHVRCAT	GRULEGVVVI	WEGGANKYIA	181

(SEQ ID NO:14)

Вектор номера 12913

ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	50
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	100
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	150
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	200
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	250
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	300
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	350
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	400
ETPACGCTE	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	GGACGCTCT	490

(SEQ ID NO:15)

Вектор номера 12914

PGEPASINCE	SSQALLHNG	INFLWYLOX	PGEPASINCE	SSQALLHNG	50
PGEPASINCE	SSQALLHNG	INFLWYLOX	PGEPASINCE	SSQALLHNG	100
PGEPASINCE	SSQALLHNG	INFLWYLOX	PGEPASINCE	SSQALLHNG	181

(SEQ ID NO:16)

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

CDR	DP50	3.1.1	4.1.1	4.2.1	4.10.2	4.13.1	4.14.3	6.1.1	11.2.1	11.6.1	11.7.1	12.3.1.1	12.9.1.1
	G	G	G	G	G			G					
	V	V	V	V	V			G	G	G		G	
	V	V	V	V	V			V	V	V	V	V	
	Q	Q	Q	Q	Q			V	V	V	V	V	V
	P	P	P	P	P	P	P	E	Q	Q	Q	Q	Q
	G	G	G	G	G	G	G	P	P	P	P	P	P
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S
	R	R	R	R	R	R	R	L	L	L	L	L	L
	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R
	S	S	S	S	S	S	S	L	L	L	L	L	L
	C	C	C	C	C	C	C	S	S	S	S	S	S
	A	A	V	T	V	A	A	C	C	C	C	C	C
	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A
	S	S	S	S	S	S	S	A	A	A	A	A	A
	G	G	G	G	G	G	G	S	S	S	S	S	S
	F	F	F	F	F	F	F	G	G	G	G	G	G
	T	T	T	T	T	T	T	F	F	F	F	F	F
	F	F	F	F	F	F	F	T	T	T	T	T	T
CDR1	S	S	S	S	S	S	S	F	F	F	F	F	F
	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Y	Y	H	Y	H	H	H	Y	Y	Y	C	Y	Y
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	M	M	M	M	J	J	J	M	M	M	M	V	M
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	G	G	G	G	G	G	G	K	K	K	K	K	K
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
CDR2	G	G	G	G	G	G	G	D	D	D	D	D	D
	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
	H	H	N	N	N	N	N	N	N	H	H	N	N
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	Y	Y	Y	H	D	D	D	H	Y	Y	Y	Y	Y
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	K	K	K	K	K	K	K	A	V	V	V	V	V
	G	G	G	G	G	G	G	K	K	K	K	K	K
	R	R	R	R	R	R	R	G	G	G	G	G	G
	F	F	F	F	F	F	F	R	R	R	R	R	R
	T	T	T	T	T	T	T	F	F	F	F	F	F
	I	I	I	I	I	I	I	T	T	T	T	T	T
	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I
	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R

UA 76936 C2

UA 76936 C2

Фирпа 2

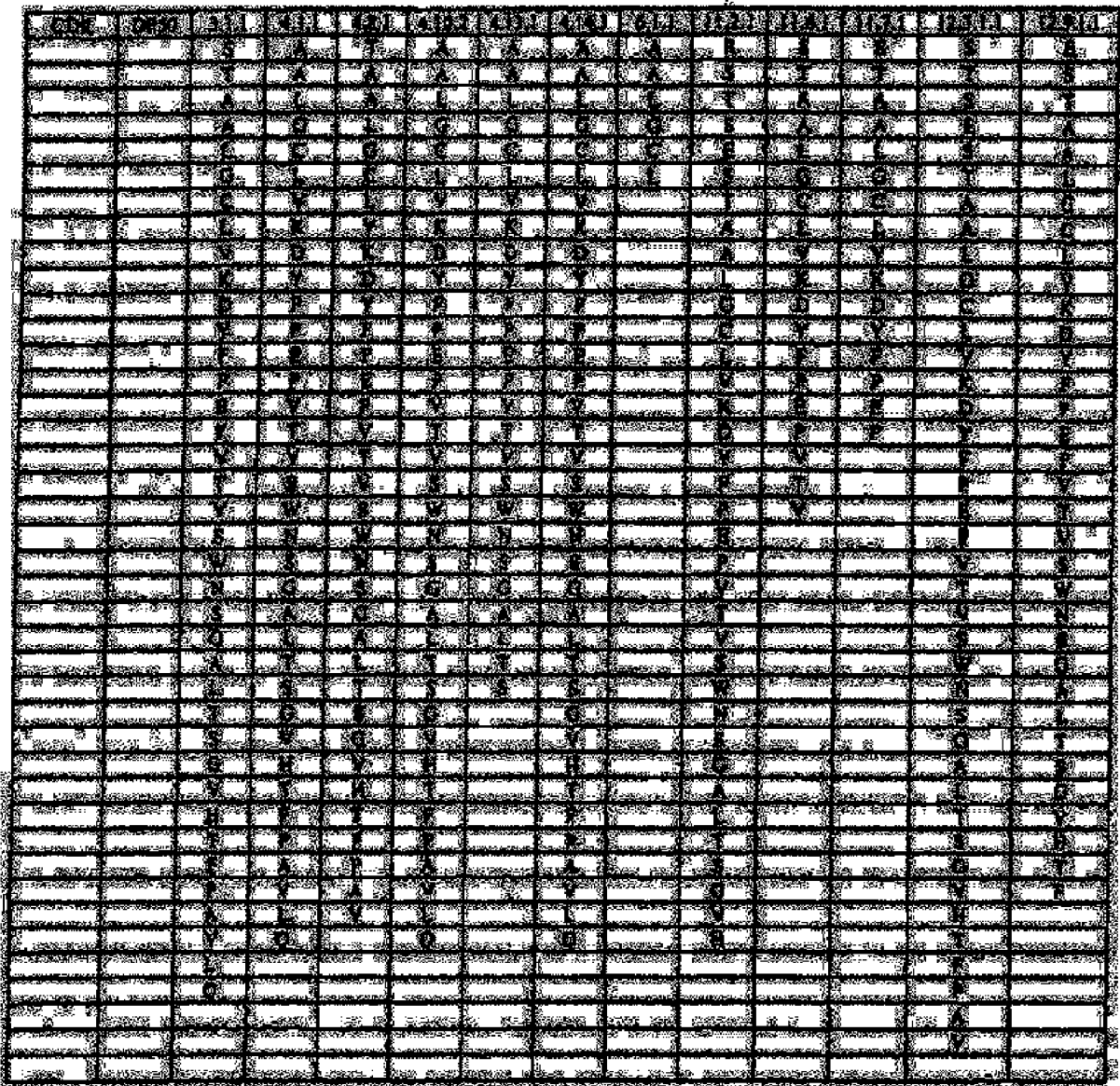
CDR	DP50	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10.2	4.13.1	4.14.3	6.1.1	11.2.1	11.6.1	11.7.1	12.3.1.1	12.9.1.1
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	N	N	N	N	N	N	K	N	N	N	N	S	N
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	Y	Y	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Y	Y	Y	Y	V	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
		G	G	G	V	V	V	A	D	G	G	D	D
		A	G	E	A	A	A	G	F	A	T	S	Q
		R	H	R	P	P	P	L	R	V	M	Y	Q
		I	F	L	L	L	L	L	Q	V	J	Y	T
CDR3		I	G	G	G	G	G	G	A	V	V	D	Q
		T	P	S	P	P	P	Y	T	P	V	F	W
		P	F	Y	L	L	L	F	L	A	G	W	Y
		C	D	F	D	D	D	D	Y	A	T	S	G
		M	Y	D	Y	Y	Y	Y	Y	M	L	G	G
		D	W	Y	W	W	W	W	Y	D	D	R	F
		V	G	W	G	G	G	G	Y	V	Y	G	D
		W	Q	G	Q	Q	Q	Q	Y	W	W	G	F
		G	G	Q	G	G	G	G	G	Q	G	M	W
		Q	T	G	T	T	T	T	M	Q	Q	D	G
		G	L	T	L	L	L	L	D	G	G	V	Q
		T	V	L	V	V	V	V	V	T	T	W	G
		T	T	V	T	T	T	T	W	T	L	G	T
		V	V	T	V	V	V	V	G	V	V	Q	L
		T	S	V	S	S	S	S	Q	T	T	G	V
		V	S	S	S	S	S	S	G	V	V	T	T
		S	A	S	A	A	A	A	T	S	S	T	V
		S	S	A	S	S	S	S	T	S	S	V	S
		A	T	S	T	T	T	T	V	A	A	T	S
		S	K	T	K	K	K	K	T	S	S	V	A
		T	G	K	G	G	G	G	V	T	T	S	S
		K	P	G	P	P	P	P	S	K	K	S	T
		G	S	P	S	S	S	S	S	G	G	A	K
		P	V	S	V	V	V	V	A	P	P	S	G
		S	F	V	F	F	F	F	S	S	S	T	P
		V	P	F	P	P	P	P	T	V	V	K	S
		F	L	P	L	L	L	L	K	F	F	G	V
		P	A	L	A	A	A	A	G	P	P	P	F
		L	P	A	P	P	P	P	P	L	L	S	P
		A	C	P	C	C	C	C	S	A	A	V	L
		P	S	C	S	S	S	S	V	P	P	F	A
		C	R	S	R	R	R	R	F	C	C	P	P
		S	S	R	S	S	S	S	P	S	S	L	C
		R	T	S	T	T	T	T	L	R	R	A	S
		S	S	T	S	S	S	S	A	S	S	P	R
		T	E	S	E	E	E	E	P	T	T	C	S
		S	S	E	S	S	S	S	C	S	S	S	T
		E	T	S	T	T	T	T	S	E	E	R	S

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Figure 1



U A 7 6 9 3 6 C 2

Figure 1

Proteinase DF-55-66-4-1

YGGGSSGGGCTEWIRHDPKGLWIGVYGGCTINPSLKERVTISVDISENQPFKLSVTAADTAVVTCAR
CDR1 CDR2

Proteinase DF-55-66-4-1

SGGGLVQPSQISCTCTVGGSSSSGGCTEWIRHDPKGLWIGVYGGCTINPSLKERVTISVDISENQPFKLSVTAADTAVVTCAR
CDR1 CDR2
DSDA YGDAVWGGCTVWSSASTLQPSVPLAPCRSTSEDAAGCLVGYSEPTVYEWNSCALTGVHTDAVLC
CDR3

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Block 1000 A27

HYVLTQSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3

Block 1000 A28

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A29

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
HGGTGMERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A30

QTLSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A31

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A32

SPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A33

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A34

Block 1000 A35

DIQDTQSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3

Block 1000 A36

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A37

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A38

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A39

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

Block 1000 A40

Block 1000 A41

HYVLTQSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3

Block 1000 A42

QSPDTHLSLSPGERATLSCRAAGSNTSLAYTQKQPGAPRLIVGASSTATQPDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYVCOOYKNSI
CDR1 CDR2 CDR3
FGQDTKYDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNYPRKAKV

U. 76936 C2

1000KASIKYKLAIVVAPALHISQDSSTYQDIYHACITVAKKE
 CDR1 CDR2 CDR3
 HWSAATGGLVDECTTQEFATLDDQALITVAIDQKAGDSVHILKATKATVAGALHGLDQEGQDQDILLIKPFAAYEDAGAAACHQKQDHLF
 Black Box Number 12.1
 DAAAKQALGIFALITDQVDECTTQEFATLDDQALITVAIDQKAGDSVHILKATKATVAGALHGLDQEGQDQDILLIKPFAAYEDAGAAACHQKQDHLF
 CDR1 CDR2 CDR3
 TQVAM DAE VTI
 CDR1
 IDH Y64 T
 IDH Y64 S
 TQVAM TAE A/A19
 DIVHTDPLSLAVTPQFASSQSSNLLISNGYNYLDWYLFQDQDQDILLVGSNFAQGVDFKSGSGSDTFLLSRVFAEDVGVYYCYDALDTL
 CDR1 CDR2 CDR3
 Black Box Number 12.2
 FGFASINCHSSQLLISNGYNYLDWYLFQDQDQDILLVGSNFAQGVDFKSGSGSDTFLLSRVFAEDVGVYYCYDALDTL
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGGGKVKKRTVAATSVHFTSDQELKSTASVYCLNDFYR

U A 7 6 9 3 6 C 2

Фігура 9
 МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ЛЮДИНИ ДО СТЛА
 Аналіз аміно-кінцевої амінокислотної послідовності

Гібридома	Легкий ланцюг	
CT2.1.3	не визначали	не визначали
CT3.1.1	NH ₂ -DIQMTQSPSSLSASVGDRV	26.119
CT4.1.1	NH ₂ -EIVLTOSPGTSLSPGERAT	23.917
CT4.8.1	NH ₂ -EIVLTOSPGTSLSPGERAT	23.617
CT4.9.1	NH ₂ -DIOMTOSPSSVSASVGDRV	23.702
CT4.10.2	NH ₂ -TGEFVLTQSPGTSLSPGER (60 %) NH ₂ -EFVLTQSPGTSLSPGERAT (40%)	24.101
CT4.14.3	NH ₂ -EIVLTQSPGTSLSPGERAT	23.770
CT4.13.1	NH ₂ EIVLTQSPGTSLSPGERAT	23.802
CT6.1.3	NH ₂ -EIVLTQSPGTSLSP	23.747

Гібридома	Важкий ланцюг	Мол. вага
CT2.1.3	не визначали	не визначали
CT3.1.3	NH ₂ -блокована. Після обробки піроглутаматамінопептидазою NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSRLS (основна послідовність-80%) NH ₂ -PEVQF... (мінорна послідовність-20%)	51,813
CT4.1.1	NH ₂ -блокована. Після обробки піроглутанатамінопептидазою NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (основна послідовність-65%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (мінорна послідовність – 35%)	51.502
CT4.8.1	NH ₂ -блокована. Після обробки піроглутанатамінопептидазою NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPG(R)SL (основна послідовність-80%) NH ₂ -PEVQFNWY... (мінорна послідовність – 40%)	51,597
CT4.9.1	NH ₂ -EVQLLESGGGLVQPGGSLRL (вільна кінцева аміногрупа)	51,437
CT4.10.2	NH ₂ -блокована. Після обробки піроглутаматамінопептидазою NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (основна послідовність - 60%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (мінорна послідовність – 40%)	51,502
CT4.14.3	NH ₂ -блокована. Після обробки піроглутаматамінопептидазою NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSL(R)(L)(S) (основна послідовність-65%) NH ₂ -PEVQFNWYV... (мінорна послідовність - 35%)	51,293
CT4.13.1	NH ₂ -блокована. Після обробки піроглутаматамінопептидазою NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (основна послідовність - 75%) NH ₂ -PEVQFN... (мінорна послідовність - 25%)	51,305
CT6.1.1	NH ₂ - блокована. Після обробки піроглутаматамінопептидазою NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVEPGRSLRLS * (основна послідовність - 65%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (мінорна послідовність - 35%)	51/176

* Ця послідовність важкого ланцюга схожа на інші блоковані послідовності важкого ланцюга за виключенням унікальної заміни Gln > Glu в положенні 13.
 ABQENIX • CONFIDENTIAL

Order ID

Copy 10A

[illegible]

Oil index = 0.633 with fuel

FL

CLIP 2 10B

1997

0192110

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

917/PM 100

[illegible]

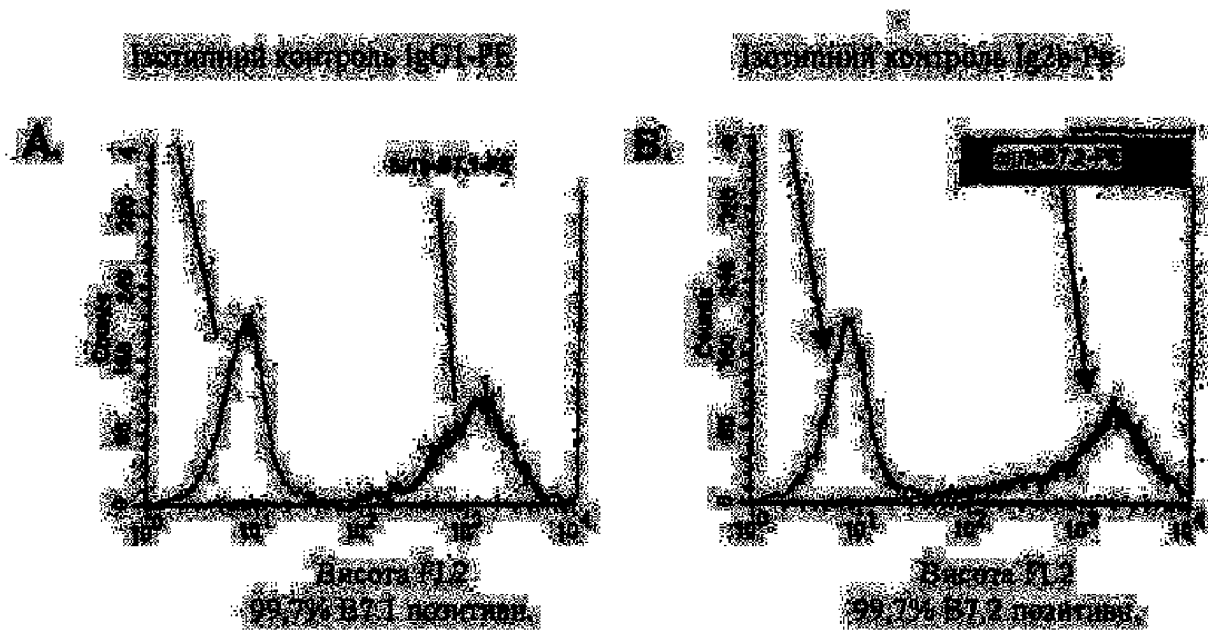
UVA 7693E C2

U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Фигура 17

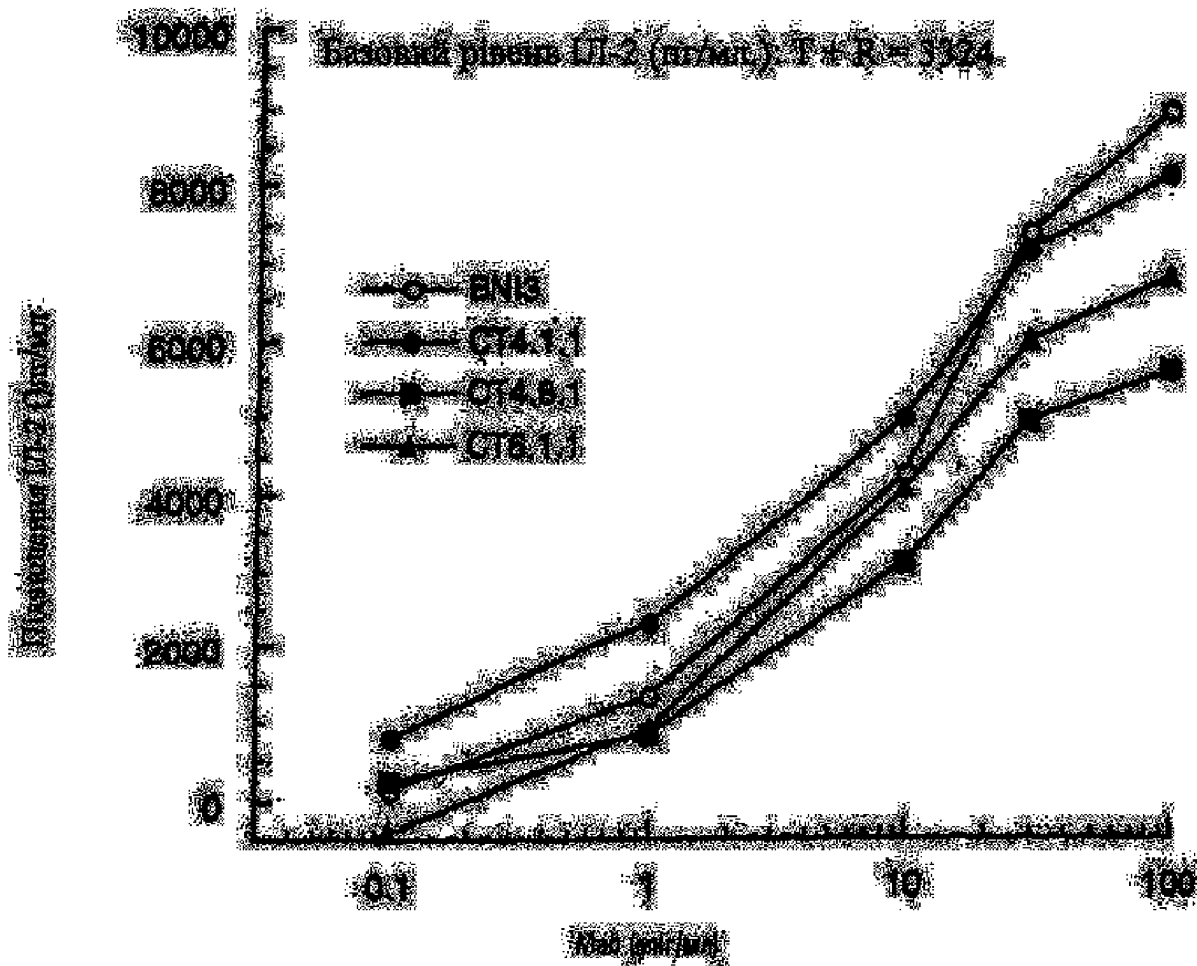
Экспрессия B7.1 и B7.2 на клетках Raji



U A 7 6 9 3 6 C 2

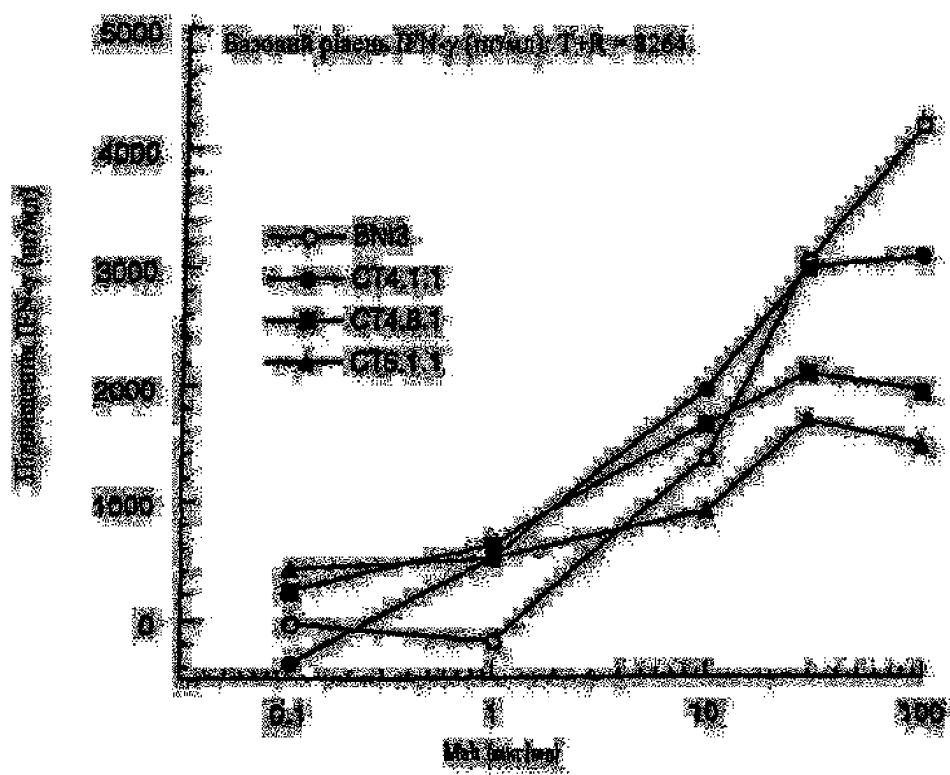
Фігура 12

Плавильна утворення ПІ-2 Т-клетками людини, відлучене Майс Херо Моусе
72-годинного тесту Т-лімфоцитів/Raj



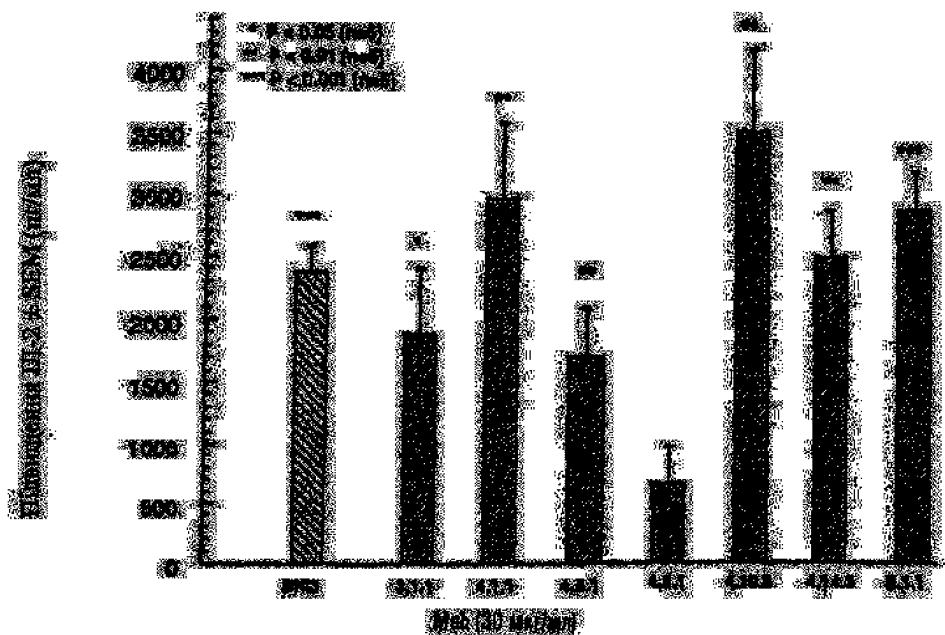
Фигура 13

Підвищення утворення IFN- γ Т-клітинами людини, індуковане MAb's XenoMouse проти CTLA-4 в 72-годинному тесті Т-лімфобластів/Raji



Визначення утворення IL-2 T-клітинними популяціями, одержаними Mabs Xeno Mouse проти CTLA-4 в 72-годинному тесті T-лімфобластів/Raji (6 днів)

Базовий рівень IL-2 (p/w/ml): T+R=9117, T+R+IgG34=9389, T+R+IgG2=8509



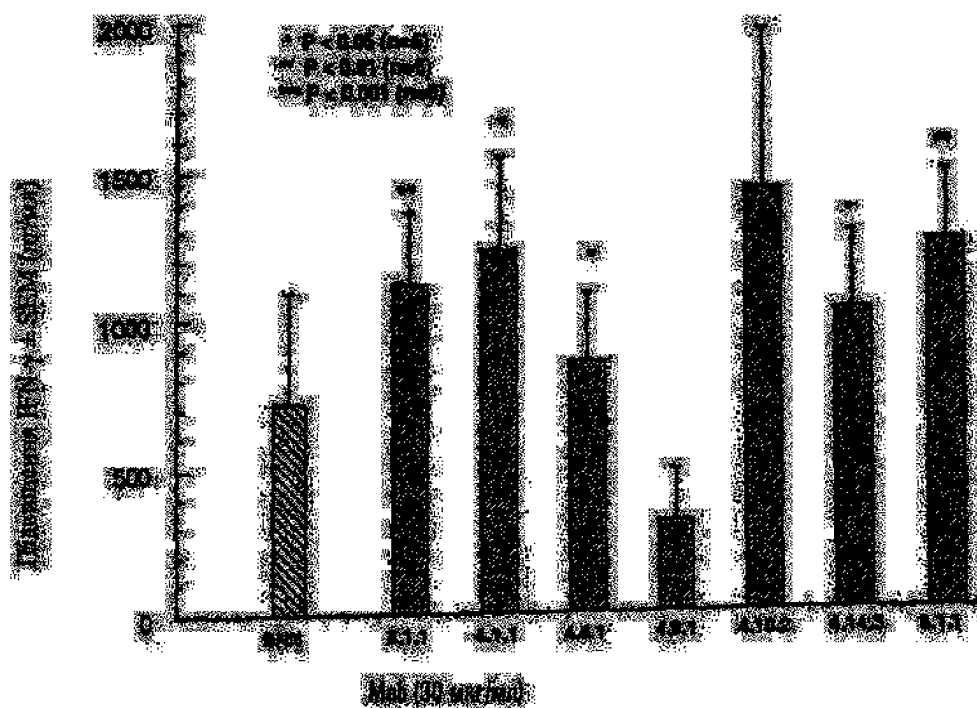
U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

Фигура 15

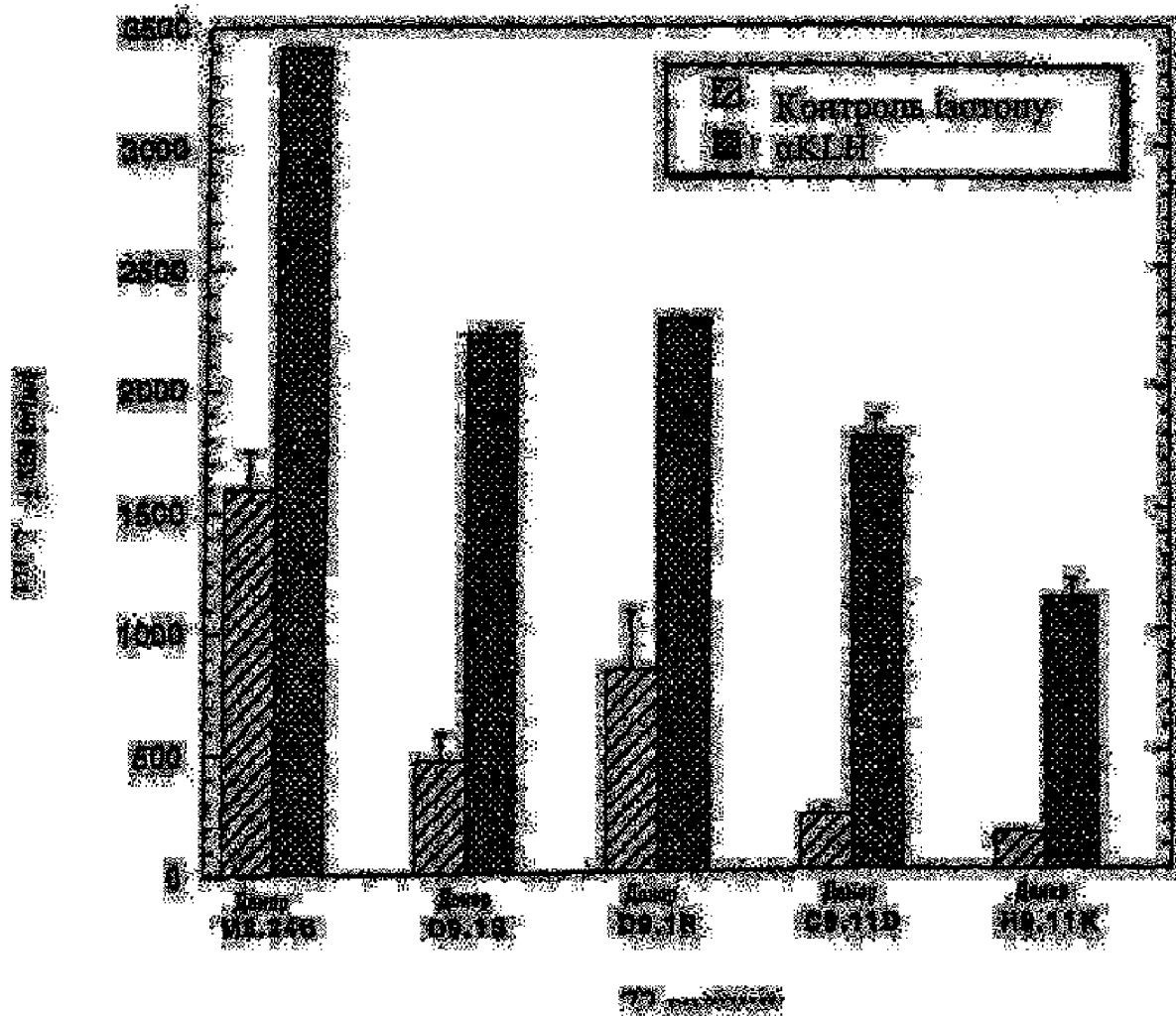
Підвищення утворення IFN- γ Т-клітинами людини, індуковане Mabs Xeno Моно проти С.Т.А4 в 72-годинному тесті Т-лімфоцитів(Raji) (6 донорів)

Базовий рівень IFN- γ (пг/мл): T + R = 4780, T + R + IgG2a = 4868, T + R + IgG2 = 493



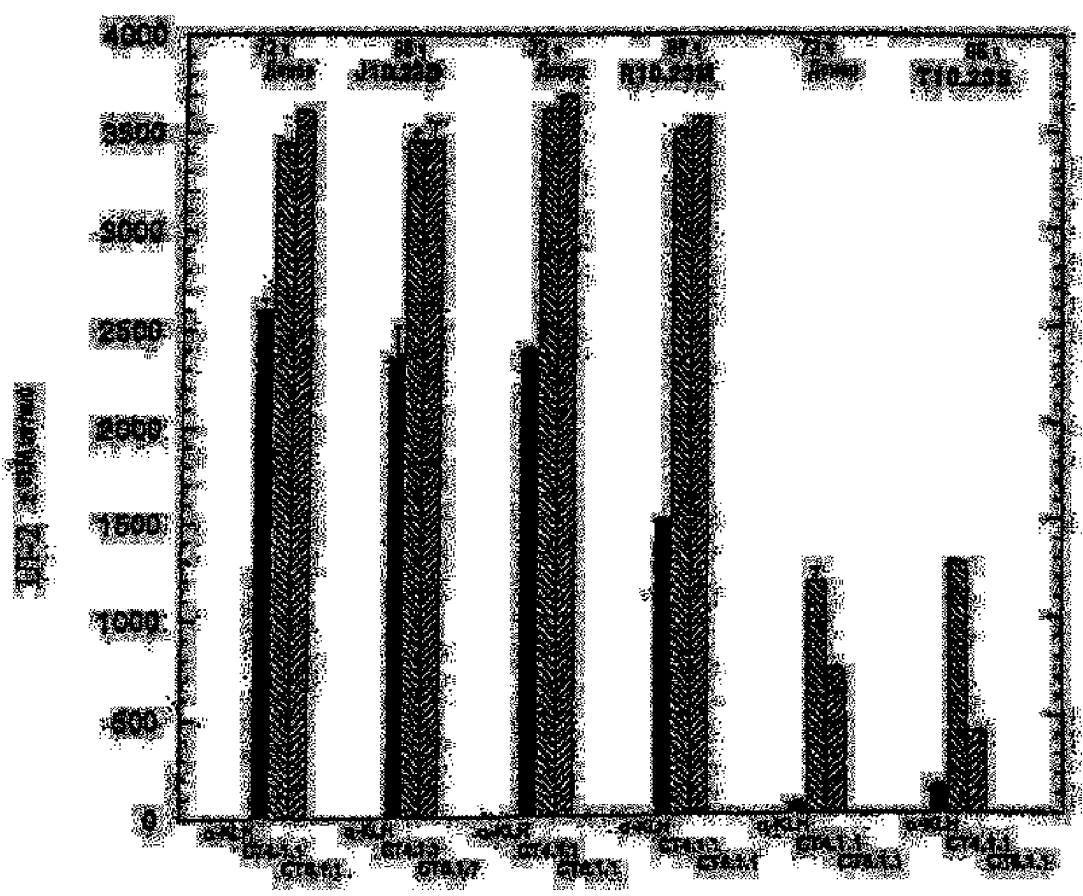
Фигура 16

Індивідуальне утворення ІІ-2, виконане Маб5 проти СІІА4 (30 нг/мл) з цитратної крові людини, стимульованій БЕА (100 нг/мл) плюс Маб проти CD3 (60 нг/мл)

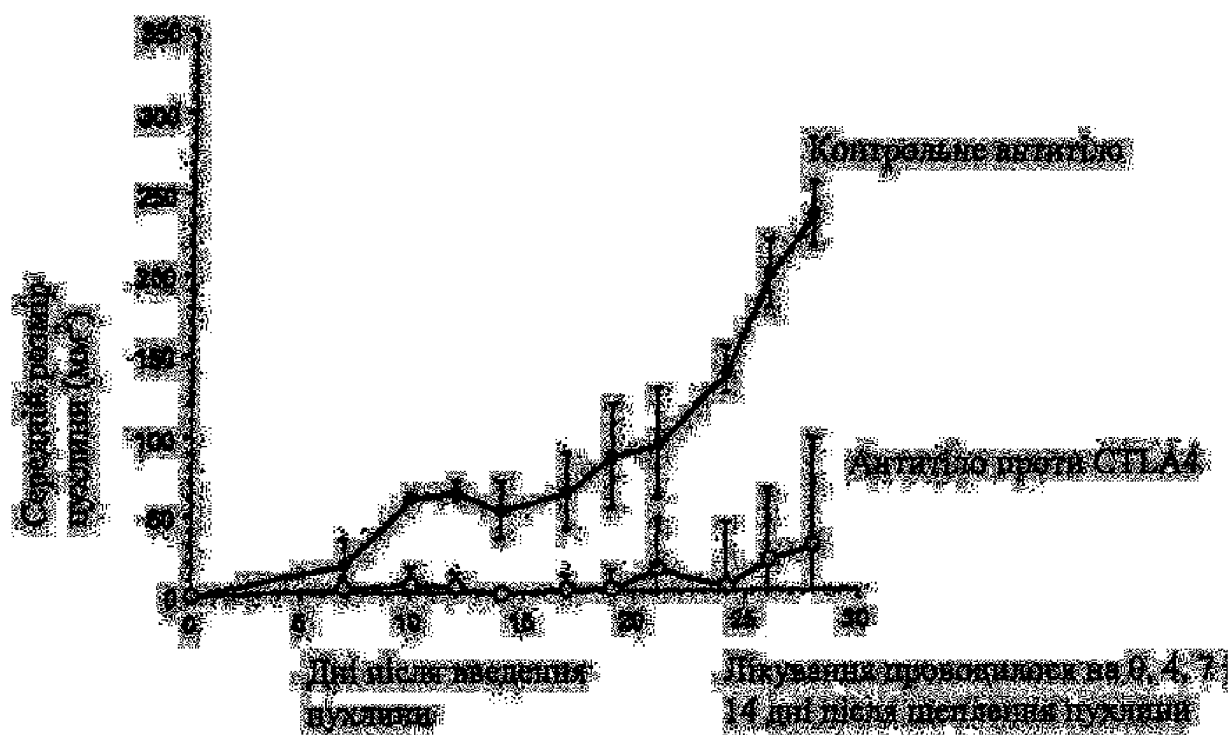


Фигура 17

Підвищення утворення IL-2, індуковане Маб проти CD134 (10 нг/мл) в сироватці крові людини, сенсибілізованій SEA (100 нг/мл) плюс Маб проти CD3 (60 нг/мл)



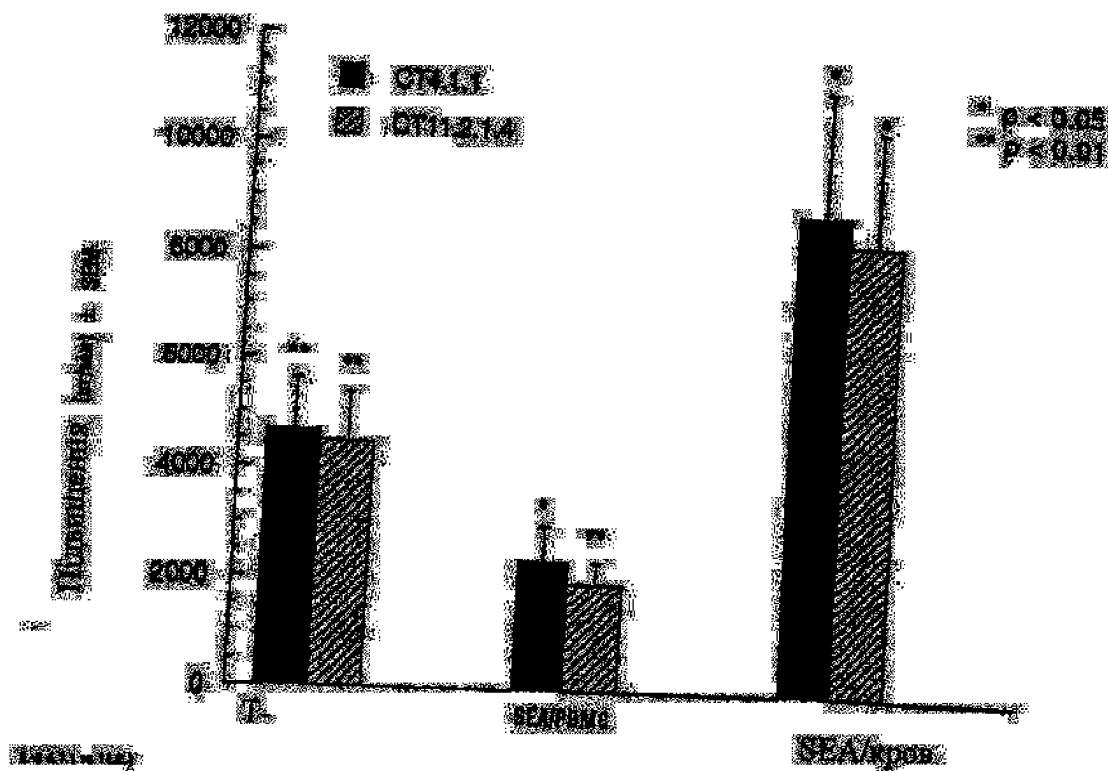
Антиген проти CTLA-4 впливає на швидкість росту у мишей



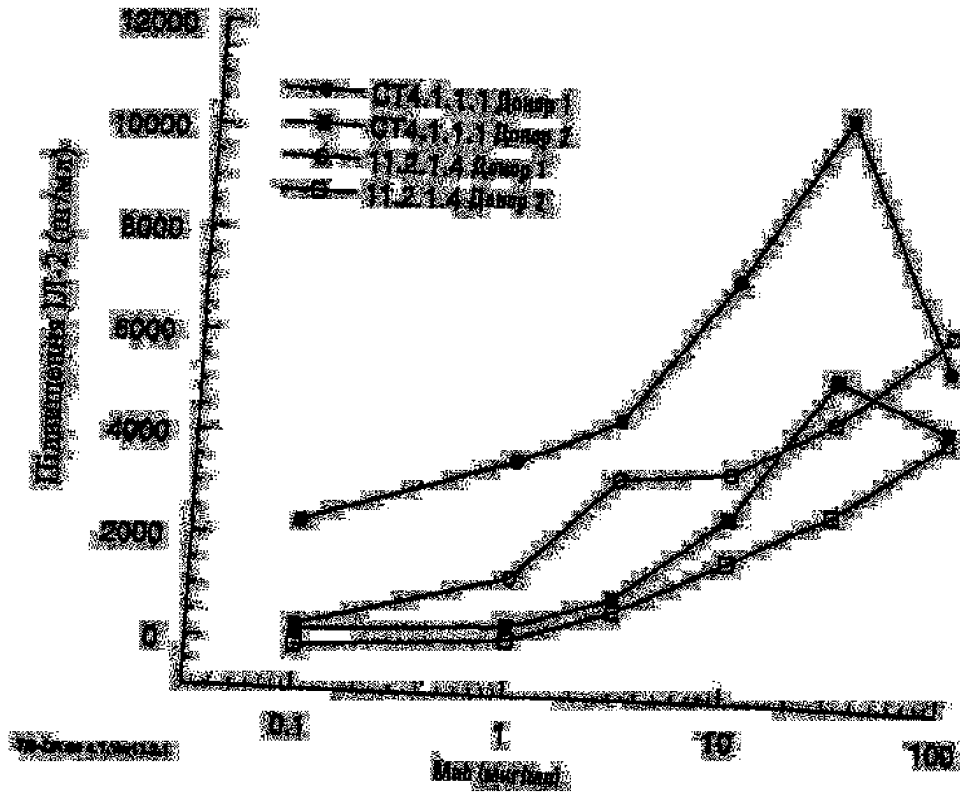
U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

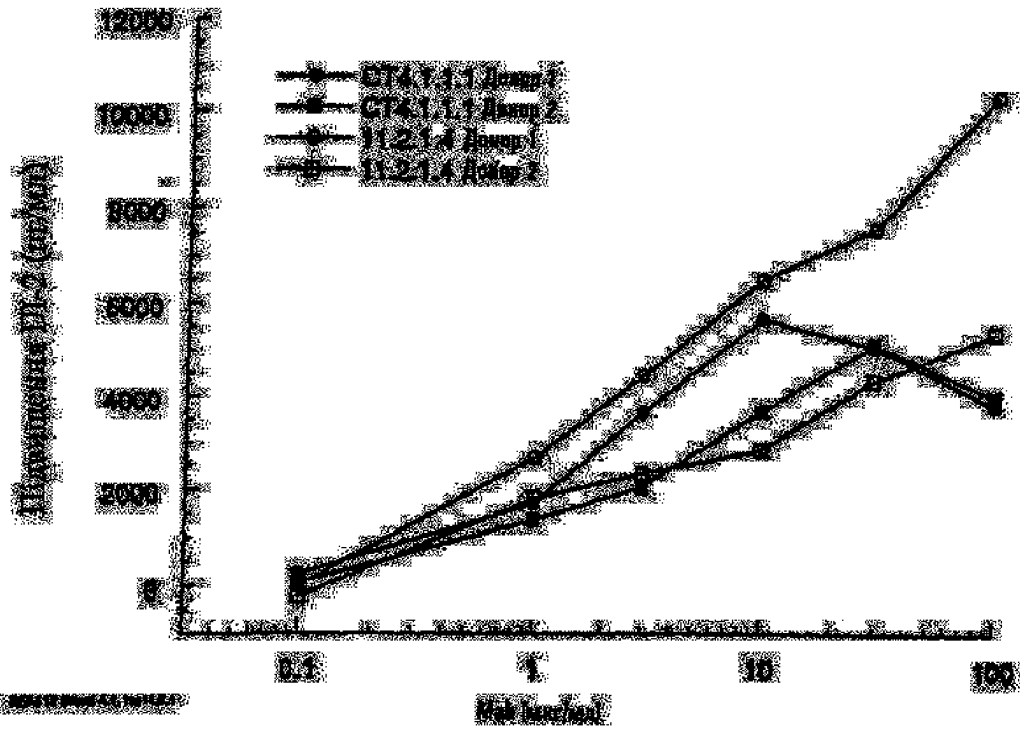
Післящеплення утворення ІЛ-2 індукowane MAb проти СІЛА4 (30 мкг/мл) в 72-годинних тестах
Т-лімфобластна/Раї (суперантисену (6 донорів))



Повышение уровня Д-Т клеточной линии, индуцированной Мавс при СЛЛА-а 72-годинную
тести Т-лимфоциты/Кап



Підвищення утворення ІІ-2, одержаного Мале проти СТЛА4 в сировинній крові, стимульований
 Суперактиватором (100 мкг/мл)



U A 7 6 9 3 6 C 2

U A 7 6 9 3 6 C 2

- Сигнальні пептиди показані жирними і великими літерами
- Відкрита рамка зчитування для геномного клону підкреслена
- Мутації, введені для утворення деглікозильованого АТ (N294Q) двічі підкреслені і надані великими літерами

Фіг. 22(a) кДНК важкого ланцюга 4.1.1 IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCACAAGAACACGCTGTTTTCTGCAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT
CGGTCTTTTGAATACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGCTCTCCTCAGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTGCTGGAATCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAG
CTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCAC
CGTGCCCAAGCACCTGTGGCAGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG
TTCCGTGTGCTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCACTCTGACCTGCTGCTCAA
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACCTACAAGACCAACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:53)

Фіг. 22(b) Геномна ДНК важкого ланцюга 4.1.1 IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC

GATTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAGGTCACTT
CGGTCTCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACGCTCTCCTCAGCTA
GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAG
CTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCAGCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGGTGAGAGGCCAGCTCAGGGAGGGAGGG
TGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGC
AGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGC
CTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCACCA
GGCTCCAGGCAGGCACAGGCTGGGTGCCCTACCCAGGCCCTTCACACACAG
GGGCAGGTGCTTGGCTCAGACCTGCCAAAAGCCATATCCGGGAGGACCTGCC
CCTGACCTAAGCCGACCCCAAAGGCCAAACTGTCCACTCCCTCAGCTCGGACA
CCTTCTCTCTCCAGATCCGAGTAACCTCCAATCTTCTCTCTGACAGAGCGCA
AATGTTGTGTGAGTGGCCACCGTGGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCCTCGCCC
TCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC
CCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCAACCTCCATCTCTTCTCAGCACCACTGTG
GCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTT
CACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGT
GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCT
CTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ
 ID NO: 54)

Фіг. 22(с) Білок важкого ланцюга 4.1.1 IgG2

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSS
 HGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGRNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLOMN
 SLRAEDTAVYYCARGGHFGPFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
 ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPFCPAPPVAGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 FRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP
 PSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LDSGSPF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 63)

Фіг. 22(d) кДНК N294Q важкого ланцюга 4.1.1 IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
CATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT
CGGTCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAG
CTGTCTTACAGTCTTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAATGTTGTGTGAGTGCCAC
CGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCCAAGCACG
TTCCGTGTGGTTCAGCGTCTTACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTACCCACGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:55)

Фіг. 22(e) Білок N294Q важкого ланцюга 4.1.1 IgG2

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSS
HGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMN
SLRAEDTAVYYCARGGHFGPFDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQST
FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLF
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 64)

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTT
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGC
AGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT
CATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCA
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGAT
TTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTACCTCACCCTGGACGTTCCGGCCA
AGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT
TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCAC
AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO:56)

METPAQLLFLLLLWLPTDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSI
SSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSTDFLTISRLEPED
FAVYYCQYGTSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:65)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAAC
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACACTATGGAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTACCATCTCCAGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGAGAGACT
GGGTCCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC
CAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCC
CACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA

AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGT
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:57)

Фіг. 22 (i) Білок важкого ланцюга 4.8.1

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSN
YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKHYGDSVKGRFTISSDNSKNTLYLOMN
SLRAEDTAVYYCARGERLGSYFDYWQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TFRVVSFLTIVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:66)

Фіг. 22 (i) ДНК капа ланцюга 4.8.1

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTGTTAGCAGCAGT
TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA
TGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
GTCTATTACTGTGAGCAGTATGGCATCTCACCTTCACTTTCGGCGGAGGGAC
CAAGGTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC
CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAAT
AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA
ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO:58)

Фіг. 22 (к) Білок капа ланцюга 4.8.1

METPAQLLFLLLLWLFPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRTSVSSS
YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA
VYYCQQYGISPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:67)

Фіг. 22 (l) ДНК важкого ланцюга 6.1.1

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCGAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGT
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGCAATAAACACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGGACTGCT
GGGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAG
CTGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCTGAGTGCCAC
CGTGCCACAGCACCTGTGGCAGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG
TTCCGTGTGGTCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:59)

Фіг. 22 (m) Білок важкого ланцюга 6.1.1

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVEFGRSLRLSCTASGFTFSS
YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKHYSADSAKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCARAGLLGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPFPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST

FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 68)

Fig. 22(n) ДНК капа ланцюга 6.1.1

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAAAGTGTTAGC
AGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCCCTCAT
CTATGGTGTATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT
GCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTATCTCACCATTCACTTTCGGCCCTGG
GACCAAAGTGGATATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA
CCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 60)

Fig. 22 (o) Білок капа ланцюга 6.1.1

METPAQLLEFLLLWLPLDTTGEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVS
SYLAWYQQKPGQAPRPLIYGVSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
AVYYCQQYGISPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 69)

Fig. 22 (p) ДНК важкого ланцюга 11.2.1 IgG2:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTCAAGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGAGGGG
AGCTACCCTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA
CGGTACCCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA
GGAATACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCA
GCGGCGTGACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC

AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTG
CAACGTAGATCAACAAGCCCAAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCA
AATGTTGTGTGCGAGTGCCCAACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCA
GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG
GAGGAGCAGTTCACAGCACGTTCCTGTGGTTCAGCGTCTCACCGTTGTGCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID
NO: 61)

Фіг. 22 (g) ок важкого ланцюга 11.2.1 IgG2: Біл

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAVIY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLY
YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSNFGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 70)

Фіг. 22 (r) ДНК важкого ланцюга 11.2.1 IgG2:

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCT
GGCTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC
CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCCGGCAAGTCAGAG
CATTACAGCTATTTAGATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCCCTAAAC
TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACT
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATTACAGTACTCCATTCACTTTCG
GCCCTGGGACCAAAGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTG
CCTGCTGAATACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA
GAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCC
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTGA (SEQ ID NO: 62)

Фіг. 22 (s) Білок капа ланцюга 11.2.1 IgG2:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATYYCQOYYSTPFTFGPGTKVEI
KRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO: 71)

мікросхем", 2006, N 10, 15.10.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

UA 76936 C2

UA 76936 C2