



MD/EP 3443009 T2 2022.02.28

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3443009 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 16/28 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0216 (22) Data de depozit: 2017.04.11 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17717393.7, 2017.04.11 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3443009, 2019.02.20 (31) Numărul cererii prioritare: 201662321476 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.04.12 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 02/2022, 2022.02.28 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 36/2021, 2021.09.08 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2019, 2019.03.31
(71) Solicitant: SYMPHOGEN A/S, DK (72) Inventatori: LINDSTED Trine, DK; GJETTING Torben, DK; GALLER Gunther Roland, DK; GAD Monika, DK; GRANDAL Michael Monrad, DK; KOEFOED Klaus, DK; KRAGH Michael, DK; HORAK Ivan David, US; BOUQUIN Thomas, DK; PEDERSEN Mikkel Wandahl, DK (73) Titular: SYMPHOGEN A/S, DK (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Anticorpi anti-TIM-3 și compoziții

(57) Rezumat:

1

Această invenție se referă la anticorpi anti-TIM-3 și la compoziții de anticorpi și la utilizarea lor în creșterea imunității la un pacient, de exemplu, pentru a trata cancerul.

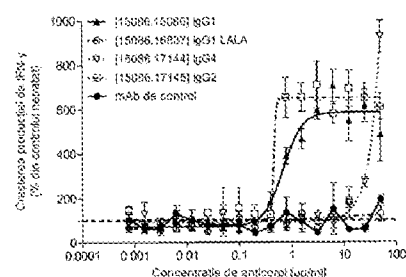
Secvențe: 240

Revendicări: 15

Figuri: 9

2

Figura 1



(54) Anti-TIM-3 antibodies and compositions**(57) Abstract:**

1
This invention relates to anti-TIM-3 antibodies and antibody compositions and their use in enhancing immunity in a patient, e.g., to treat cancer.

2
Sequences: 240
Claims: 15
Fig.: 9

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****STADIUL TEHNICII**

TIM-3 (imunoglobulină de celule T și care conține domeniul de mucină 3), cunoscută, de asemenea, sub numele de HAVCR2 (receptor celular 2 al virusului hepatitei A) sau CD366, este un membru al familiei de proteine de imunoglobulină de celule T și domeniu de mucină. TIM-3 este codificată la oameni de către gena *Havcr2* și este o glicoproteină de tip I de 33 kDa cu un domeniu IgV distal de membrană și un domeniu de mucină proximal de membrană. Conține o regiune conservată de cinci reziduuri Tyr în domeniul intracelular, care sunt fosforilate la legarea ligandului. TIM-3 este exprimată de o serie de celule diferite care provin din ambele brațe adaptative și înăscute ale sistemului imunitar, inclusiv celulele T, celulele dendritice, macrofagele, și celulele natural killer (NK). Exprimarea TIM-3 este scăzută în celulele T naive, dar devine puternic reglată în sus la activarea celulelor T. Spre deosebire de celulele T, celulele înăscute, cum ar fi celulele dendritice, celulele NK și monocitele, au o exprimare bazală a TIM-3 ridicată. TIM-3 a fost asociată cu mai mulți liganzi, în mare parte promiscui, inclusiv galectina-9, fosfatidilserina, CEACAM-1 și HMGB-1, dar rolurile exacte ale acestor liganzi sunt în prezent necunoscute.

Cu toate că s-a sugerat că TIM-3 este un inhibitor al punctului de control, există dovezi relativ rare care să susțină ideea că TIM-3 mediază în mod direct suprimarea activării celulelor T sau secreția de citokine într-o manieră similară cu, de ex., PD-1. Mai mult decât atât, și spre deosebire de PD-1, TIM-3 pare să joace un rol în reglarea celulelor sistemului înăscut, și în special a celulelor dendritice. Publicația de brevet de invenție PCT WO 2013/006490 și Kikushige și Miyamoto (Int J Hematol., 98: 627-33 (2013)) se referă la anticorpi anti-TIM-3 murini și iau în considerare utilizarea lor pentru detectarea și/sau tratamentul cancerului. Majoritatea datelor funcționale legate de TIM-3 și rolul său în imunologia tumorii provin din studii *in vivo* folosind diverși anticorpi. În majoritatea acestor studii, din cauza validării slabe a anticorpilor, nu este clar dacă efectele anticorpilor TIM-3 sunt mediate de inhibarea legării ligandului sau de un efect agonist asupra țintei.

Având în vedere proprietățile sale de reglare a răspunsului imun, TIM-3 a fost investigată ca o țintă potențială pentru imunoterapie, inclusiv pentru tratamentul cancerului și al bolilor autoimune. Un singur anticorp anti-TIM-3 este în prezent în dezvoltare clinică, dar în prezent nu există anticorpi anti-TIM-3 aprobați.

Având în vedere rolul critic al TIM-3 ca un modulator imunitar, este nevoie de terapii imune noi și îmbunătățite care să țintească TIM-3 pentru a trata cancerul și anumite tulburări ale sistemului imunitar.

EXPUNEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție este îndreptată spre noi anticorpi recombinanți, așa cum sunt definiți în revendicări, care țintesc TIM-3, precum și compoziții farmaceutice care cuprind unul sau mai mulți dintre acești anticorpi, de ex., un anticorp anti-TIM-3 care, prin intermediul activității asupra TIM-3 activează diverse celule imune, cum ar fi celulele prezentatoare de antigen profesionale (de ex., celulele dendritice și macrofagele) și celulele T (de ex., celulele T helper și celulele T citotoxice). Prezenta invenție este îndreptată, de asemenea, spre utilizarea anticorpilor și a compozițiilor farmaceutice pentru creșterea imunității la un pacient, și pentru tratamentul cancerelor care provin din țesuturi precum piele, plămân, intestin, ovar, creier, prostată, rinichi, țesuturi moi, sistemul hematopoietic, cap și gât, ficat, vezică urinară, sân, stomac, uter și pancreas. Comparativ cu tratamentele disponibile în prezent pentru astfel de cancere, inclusiv tratamentele cu anticorpi, se are în vedere că anticorpii din invenție pot oferi un răspuns clinic superior fie singuri, fie în combinație cu un alt terapeutic pentru cancer, cum ar fi un anticorp care țintește o altă proteină de tip punct de control imun.

Anticorpii din prezenta invenție cuprind secvențele de aminoacizi H-CDR1-3 și L-CDR1-3 din ID. SECV. NR.: 7-12, respectiv. În unele variante de realizare, prezenta invenție furnizează un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, unde anticorpul anti-TIM-3 este anticorpul menționat în acest document ca anticorp 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086 sau 17144.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, unde anticorpul anti-TIM-3 este anticorpul menționat în acest document ca anticorp 20131, 20293, 15105, 15107, 15109, 15174, 15175, 15260, 15284, 15299, 15353, 15354, 17244, 17245, 19324, 19416, 19568, 20185, 20300, 20362, sau 20621 sau o variantă a oricăruia dintre aceștia, unde varianta poate conține, de ex., anumite modificări minime de aminoacizi în raport cu respectivul anticorp (de ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10 modificări de aminoacizi, care pot fi, de ex., în regiunile cadru) fără a pierde specificitatea de legare la antigen a anticorpului.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care concurează pentru legarea la TIM-3 uman cu, sau se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca, oricare dintre anticorpii 15086, 15086,

15086,16837, 15086,17145, 15086,17144, 20131, 20293, 15105, 15107, 15109, 15174, 15175, 15260, 15284, 15299, 15353, 15354, 17244, 17245, 19324, 19416, 19568, 20185, 20300, 20362, și 20621.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde o H-CDR3 care cuprinde secvența de aminoacizi H-CDR3 din SECV ID NR: 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, sau 232.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde H-CDR1-3 care cuprind secvențele H-CDR1-3, respectiv, din SECV ID NRs: 30-32, 40-42, 50-52, 60-62, 70-72, 80-82, 90-92, 100-102, 110-112, 120-122, 130-132, 140-142, 150-152, 160-162, 170-172, 180-182, 190-192, 200-202, 210-212, 220-222, sau 230-232.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care este cel puțin 90% (de ex., cel puțin 92%, cel puțin 95%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99%) identic în secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un VH care cuprinde SECV ID NR: 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 sau 228.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un lanț greu (HC) care cuprinde secvența de aminoacizi VH din SECV ID NR: 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228 și secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu (CH) din SECV ID NR: sau SECV ID NR: 5 sau SECV ID NR: 23, 24 sau 25.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde o L-CDR3 care cuprinde secvența de aminoacizi L-CDR3 din SECV ID NR: 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225,

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde L-CDR1-3 care cuprind secvențele L-CDR1-3, respectiv, din SECV ID NRs: 33-35, 43-45, 53-55, 63-65, 73-75, 83-85, 93-95, 103-105, 113-115, 123-125, 133-135, 143-145, 153-155, 163-165, 173-175, 183-185, 193-195, 203-205, 213-215, 223-225, sau 233-235.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care este cel puțin 90% (de ex., cel puțin 92%, cel puțin 95%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99%) identic în secvență cu secvența de aminoacizi VL din SECV ID NR: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un VL care cuprinde secvența de aminoacizi VL din SECV ID NR: 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un lanț ușor (LC) care cuprinde secvența de aminoacizi VL din SECV ID NR: 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229 și secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului ușor din SECV ID NR: 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde oricare dintre secvențele de lanț greu de mai sus și oricare dintre secvențele de lanț ușor de mai sus.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde o H-CDR3 și o L-CDR3 care cuprind secvențele de aminoacizi H-CDR3 și L-CDR3, respectiv, din SECV ID NRs: 32 și 35, 42 și 45, 52 și 55, 62 și 65, 72 și 75, 82 și 85, 92 și 95, 102 și 105, 112 și 115, 122 și 125, 132 și 135, 142 și 145, 152 și 155, 162 și 165, 172 și 175, 182 și 185, 192 și 195, 202 și 205, 212 și 215, 222 și 225, și 232 și 235.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde H-CDR1-3 și L-CDR1-3 care cuprind secvențele H-CDR1-3 și L-CDR1-3, respectiv, din SECV ID NRs: 30-35, 40-45, 50-55, 60-65, 70-75, 80-85, 90-95, 100-105, 110-115, 120-125, 130-135, 140-145, 150-155, 160-165, 170-175, 180-185, 190-195, 200-205, 210-215, 220-225, sau 230-235.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un VH care este cel puțin 90% (de ex., cel puțin 92%, cel puțin 95%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99%) identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228, și un VL care este cel puțin 90% (de ex., cel puțin 92%, cel puțin 95%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99%) identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un VH care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228, și un VL care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un LC care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 6; și un HC care cuprinde (i)

secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, sau (ii) secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228 și secvența de aminoacizi din 23, 24 sau 25.

5 În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen care cuprinde secvențele de aminoacizi H-CDR1-3 și L-CDR1-3 din:

- a) SECV ID NR: 30-35, respectiv;
- b) SECV ID NR: 40-45, respectiv;
- c) SECV ID NR: 50-55, respectiv;
- 10 d) SECV ID NR: 60-65, respectiv;
- e) SECV ID NR: 70-75, respectiv;
- f) SECV ID NR: 80-85, respectiv;
- 15 g) SECV ID NR: 90-95, respectiv;
- h) SECV ID NR: 100-105, respectiv;
- i) SECV ID NR: 110-115, respectiv;
- j) SECV ID NR: 120-125, respectiv;
- k) SECV ID NR: 130-135, respectiv;
- 20 l) SECV ID NR: 140-145, respectiv;
- m) SECV ID NR: 150-155, respectiv;
- n) SECV ID NR: 160-165, respectiv;
- o) SECV ID NR: 170-175, respectiv;
- p) SECV ID NR: 180-185, respectiv;
- q) SECV ID NR: 190-195, respectiv;
- 25 r) SECV ID NR: 200-205, respectiv;
- s) SECV ID NR: 210-215, respectiv;
- t) SECV ID NR: 220-225, respectiv; sau
- u) SECV ID NR: 230-235, respectiv.

30 În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen care concurează pentru legarea la TIM-3 uman cu, sau se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca, un anticorp ale cărui domenii variabile ale lanțului greu și ușor cuprind secvențele de aminoacizi din:

- a) SECV ID NR: 3 și 4, respectiv;
- b) SECV ID NR: 15 și 4, respectiv;
- c) SECV ID NR: 28 și 29, respectiv;
- d) SECV ID NR: 38 și 39, respectiv;
- 35 e) SECV ID NR: 48 și 49, respectiv;
- f) SECV ID NR: 58 și 59, respectiv;
- g) SECV ID NR: 68 și 69, respectiv;
- h) SECV ID NR: 78 și 79, respectiv;
- i) SECV ID NR: 88 și 89, respectiv;
- 40 j) SECV ID NR: 98 și 99, respectiv;
- k) SECV ID NR: 108 și 109, respectiv;
- l) SECV ID NR: 118 și 119, respectiv;
- m) SECV ID NR: 128 și 129, respectiv;
- n) SECV ID NR: 138 și 139, respectiv;
- 45 o) SECV ID NR: 148 și 149, respectiv;
- p) SECV ID NR: 158 și 159, respectiv;
- q) SECV ID NR: 168 și 169, respectiv;
- r) SECV ID NR: 178 și 179, respectiv;
- s) SECV ID NR: 188 și 189, respectiv;
- 50 t) SECV ID NR: 198 și 199, respectiv;
- u) SECV ID NR: 208 și 209, respectiv;
- v) SECV ID NR: 218 și 219, respectiv; sau
- w) SECV ID NR: 228 și 229, respectiv.

55 În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu și un domeniu variabil al lanțului ușor cu secvențe de aminoacizi cel puțin 90% identice cu secvențele de aminoacizi din:

- a) SECV ID NR: 3 și 4, respectiv;
- b) SECV ID NR: 15 și 4, respectiv;
- c) SECV ID NR: 28 și 29, respectiv;
- 60 d) SECV ID NR: 38 și 39, respectiv;
- e) SECV ID NR: 48 și 49, respectiv;

- f) SECV ID NR: 58 și 59, respectiv;
- g) SECV ID NR: 68 și 69, respectiv;
- h) SECV ID NR: 78 și 79, respectiv;
- i) SECV ID NR: 88 și 89, respectiv;
- 5 j) SECV ID NR: 98 și 99, respectiv;
- k) SECV ID NR: 108 și 109, respectiv;
- l) SECV ID NR: 118 și 119, respectiv;
- m) SECV ID NR: 128 și 129, respectiv;
- n) SECV ID NR: 138 și 139, respectiv;
- 10 o) SECV ID NR: 148 și 149, respectiv;
- p) SECV ID NR: 158 și 159, respectiv;
- q) SECV ID NR: 168 și 169, respectiv;
- r) SECV ID NR: 178 și 179, respectiv;
- s) SECV ID NR: 188 și 189, respectiv;
- 15 t) SECV ID NR: 198 și 199, respectiv;
- u) SECV ID NR: 208 și 209, respectiv;
- v) SECV ID NR: 218 și 219, respectiv; sau
- w) SECV ID NR: 228 și 229, respectiv.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen care cuprinde un lanț greu și un lanț ușor ale căror domenii variabile au secvențele de aminoacizi din:

- a) SECV ID NR: 3 și 4, respectiv;
- b) SECV ID NR: 28 și 29, respectiv;
- c) SECV ID NR: 38 și 39, respectiv;
- d) e)- SECV ID NR: 48 și 49, respectiv;
- 25 e) SECV ID NR: 58 și 59, respectiv;
- f) SECV ID NR: 68 și 69, respectiv;
- g) SECV ID NR: 78 și 79, respectiv;
- h) SECV ID NR: 88 și 89, respectiv;
- i) SECV ID NR: 98 și 99, respectiv;
- 30 j) SECV ID NR: 108 și 109, respectiv;
- k) SECV ID NR: 118 și 119, respectiv;
- l) SECV ID NR: 128 și 129, respectiv;
- m) SECV ID NR: 138 și 139, respectiv;
- n) SECV ID NR: 148 și 149, respectiv;
- 35 o) SECV ID NR: 158 și 159, respectiv;
- p) SECV ID NR: 168 și 169, respectiv;
- q) SECV ID NR: 178 și 179, respectiv;
- r) SECV ID NR: 188 și 189, respectiv;
- s) SECV ID NR: 198 și 199, respectiv;
- 40 t) SECV ID NR: 208 și 209, respectiv;
- u) SECV ID NR: 218 și 219, respectiv; sau
- v) SECV ID NR: 228 și 229, respectiv.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde:

- a) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 28 și 5 și un LC care cuprinde
- 45 secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 29 și 6;
- b) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 38 și 5 și un LC care cuprinde
- secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 39 și 6;
- c) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 48 și 5 și un LC care cuprinde
- 50 secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 49 și 6;
- d) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 58 și 5 și un LC care cuprinde
- secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 59 și 6;
- e) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 68 și 5 și un LC care cuprinde
- secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 69 și 6;
- f) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 78 și 5 și un LC care cuprinde
- 55 secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 79 și 6;
- g) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 88 și 5 și un LC care cuprinde
- secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 89 și 6;
- h) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 98 și 5 și un LC care cuprinde
- secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 99 și 6;
- 60 i) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 108 și 5 și un LC care cuprinde
- secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 109 și 6;

- [illegible]

- f) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 78 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 79 și 6;
- g) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 88 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 89 și 6;
- 5 h) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 98 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 99 și 6;
- i) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 108 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 109 și 6;
- j) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 118 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 119 și 6;
- 10 k) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 128 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 129 și 6;
- l) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 138 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 139 și 6;
- 15 m) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 148 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 149 și 6;
- n) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 158 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 159 și 6;
- o) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 168 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 169 și 6;
- 20 p) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 178 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 179 și 6;
- q) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 188 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 189 și 6;
- 25 r) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 198 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 199 și 6;
- s) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 208 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 209 și 6;
- t) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 218 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 219 și 6; sau
- 30 u) un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 228 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 229 și 6.

Invenția furnizează un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, unde respectivul anticorp cuprinde H-CDR1-3 și L-CDR1-3 care cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 7-12, respectiv.

În anumite variante de realizare, invenția furnizează un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, unde respectivul anticorp cuprinde un VH care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și un VL care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4.

În variante particulare de realizare, invenția furnizează un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde un lanț greu care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și 25 și un lanț ușor care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia care se leagă la un epitop al TIM-3 care cuprinde reziduurile de aminoacizi F61 și 1117 din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpul 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, 20293, sau 20131). Epitopul poate cuprinde suplimentar reziduul de aminoacid R69 (de ex., anticorpul 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, sau 20293). Epitopul poate cuprinde suplimentar P50, E62, M118, și D120 (de ex., anticorpul 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, sau 20131) și poate cuprinde suplimentar reziduurile de aminoacizi R69, V60, și G64 (de ex., anticorpul 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, sau 15086.17144).

Anticorpul sau porțiunea se poate lega la un epitop al TIM-3 care cuprinde reziduurile de aminoacizi P50, V60, F61, E62, G64, R69, I117, M118, și D120 din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpul 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, sau 15086.17144), reziduurile de aminoacizi F61, R69, și 1117 din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpul 20293), sau reziduurile de aminoacizi P50, F61, E62, 1117, M118, și D120 din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpul 20131).

Invenția furnizează un anticorp monoclonal sau o porțiune de legare la antigen a acestuia care se leagă la un epitop al TIM-3 care cuprinde reziduurile de aminoacizi 62-67 din SECV ID NR: 236 (adică anticorpul 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, sau 20293). În acest document este descris un anticorp monoclonal sau o porțiune de legare la antigen a acestuia care se leagă la un epitop al TIM-3 care cuprinde reziduurile de aminoacizi 114-117 din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpul 20131).

În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 este un anticorp IgG, de ex., un anticorp IgG uman. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde cel puțin o mutație în regiunea F_C. În variante particulare de realizare, anticorpul cuprinde o mutație în una sau mai multe dintre pozițiile de aminoacid de lanț greu 228, 233, 234 și 235, care sunt numerotate în conformitate cu schema de numerotare IMGT. Pentru exemplificare, un reziduu de aminoacid sau ambele reziduuri de aminoacizi de la pozițiile 234 și 235 pot suferi mutație la Ala, și/sau reziduu de aminoacid de la poziția 228 poate suferi mutație la Pro.

În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen din invenție are cel puțin una dintre următoarele proprietăți:

- a) se leagă la TIM-3 uman cu o K_D de 23 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață;
- b) se leagă la TIM-3 de cynomolgus cu o K_D de 22 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață;
- c) se leagă la TIM-3 uman cu o EC₅₀ de 1,2 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin ELISA;
- d) se leagă la TIM-3 de cynomolgus cu o EC₅₀ de 46 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin ELISA;
- e) crește secreția IFN- γ într-o analiză de reacție limfocitară mixtă unidirecțională;
- f) crește secreția de IFN- γ într-o analiză de reacție limfocitară mixtă bidirecțională;
- g) crește secreția de TNF- α într-o analiză de reacție limfocitară mixtă unidirecțională;
- h) crește secreția de TNF- α din celulele dendritice; și
- i) inhibă interacțiunea TIM-3 cu fosfatidilserina.

Exemplele de astfel de anticorpi includ, fără limitare, anticorpul 15086.15086 (având cel puțin proprietățile a, c, d, e, g, și h); anticorpul 15086.17145 (având cel puțin proprietățile a, c, d, e, g, h, și i), și anticorpul 15086.16837 sau 15086.17144 (având cel puțin proprietățile a, c, și d). În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen din invenție are toate dintre respectivele proprietăți. În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen are cel puțin proprietățile a, c, d, e, g, și h. În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen are cel puțin proprietățile a, c, d, e, g, h, și i. În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen are cel puțin proprietățile a, c, și d. În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen are cel puțin proprietățile a, b, c, d, e, f, și h. În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen are cel puțin proprietățile c, e, f, și h. În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen are cel puțin proprietățile c, d, e, f, și h.

În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen din invenție mărește activitatea celulelor NK. În unele variante de realizare, această activitate poate media ADCC.

În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen din invenție nu concurează pentru legarea la TIM-3 cu ABTIM3 (din publicația PCT WO 2015/117002) și/sau mAb15 (din publicația PCT WO 2016/111947). În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen din invenție nu se leagă la același epitop ca ABTIM3 și/sau mAb15; pentru exemplificare, anticorpul sau porțiunea din invenție se leagă la unul sau mai multe reziduuri de pe TIM-3 care nu sunt legate de ABTIM3 și/sau mAb15.

În alte aspecte, prezenta invenție furnizează compoziții farmaceutice care cuprind cel puțin un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, așa cum este definit în revendicări, și un excipient acceptabil din punct de vedere farmaceutic, opțional cu un agent terapeutic suplimentar, cum ar fi un agent chimioterapeutic, un agent anti-neoplazic, un agent antiangiogenic, un inhibitor al tirozin kinazei, sau un inhibitor al căii TIM-3.

Prezenta invenție furnizează suplimentar molecule de acid nucleic izolate care cuprind o secvență de nucleotide care codifică lanțul greu sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, o secvență de nucleotide care codifică lanțul ușor sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, sau ambele, ale unui anticorp anti-TIM-3 sau ale unei porțiuni de legare la antigen, așa cum este definit în revendicări.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, vectori care cuprind o astfel de moleculă de acid nucleic izolată, unde respectivul vector cuprinde suplimentar o secvență de control al exprimării.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, celule gazdă care cuprind o secvență de nucleotide care codifică lanțul greu sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, și o secvență de nucleotide care codifică lanțul ușor sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, ale unui anticorp anti-TIM-3, așa cum este definit în revendicări.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o metodă pentru producerea unui anticorp anti-TIM-3 sau a unei porțiuni de legare la antigen a acestuia, așa cum este definit în revendicări, cuprinzând furnizarea unei celule gazdă care cuprinde o secvență de nucleotide care codifică lanțul greu sau o porțiune de legare la antigen a acestuia și o secvență de nucleotide care codifică lanțul ușor sau o porțiune

de legare la antigen a acestuia ale unui anticorp anti-TIM-3 sau ale unei porțiuni de legare la antigen, așa cum este definit în revendicări, cultivarea respectivei celule gazdă în condiții adecvate pentru exprimarea anticorpului sau porțiunii, și izolarea anticorpului rezultat sau a porțiunii rezultate.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o moleculă de legare bispecifică având o porțiune de legare la antigen a unui anticorp anti-TIM-3 așa cum este definit în revendicări și o porțiune de legare la antigen a unui alt anticorp distinct, cum ar fi a unui alt anticorp anti-TIM-3 (de ex., alt anticorp anti-TIM-3 descris în acest document) sau un anticorp care țintește o proteină diferită, cum ar fi o altă proteină de tip punct de control imun, un antigen de cancer, sau o altă moleculă de suprafață celulară a cărei activitate mediază o stare de boală cum ar fi cancerul.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia sau o moleculă de legare bispecifică, așa cum se definește în revendicări, pentru utilizare în creșterea imunității la un pacient care are nevoie de acest lucru.

Prezenta invenție furnizează suplimentar un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia sau o moleculă de legare bispecifică, așa cum se definește în revendicări, pentru utilizare în tratarea cancerului la un pacient care are nevoie de acest lucru. În unele variante de realizare, cancerul provine dintr-un țesut selectat din grupul care este constituit din piele, plămân, intestin, ovar, creier, prostată, rinichi, țesuturi moi, sistemul hematopoietic, cap și gât, ficat, vezică urinară, sân, stomac, uter și pancreas. În unele variante de realizare, pacientul are leucemie (de ex., leucemie mieloidă acută), limfom Hodgkin, sau limfom non-Hodgkin. În unele variante de realizare, pacientul are o tumoră solidă (de ex., o tumoră solidă avansată sau metastatică). În unele variante de realizare, pacientul are melanom, cancer pulmonar fără celule mici, cancer colorectal, sau carcinom cu celule renale. În anumite variante de realizare, metoda cuprinde suplimentar administrarea unui agent chimioterapeutic, a unui agent anti-neoplazic, a unui agent anti-angiogenic, a unui inhibitor al tirozin kinazei, și/sau a unui inhibitor al căii TIM-3.

Prezenta invenție furnizează suplimentar anticorpi anti-TIM-3 sau porțiuni de legare la antigen sau molecule de legare bi-specifice așa cum se descrie în acest document pentru utilizare în tratamentele menționate mai sus, adică, tratamentul unui pacient uman care are nevoie de acesta pentru a-și îmbunătăți sistemul imunitar, și tratamentul unui pacient uman cu cancer, cum ar fi unul dintre cancerele menționate mai sus. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, articole de fabricație care cuprind anticorpii anti-TIM-3 sau porțiunile de legare la antigen sau moleculele de legare multi-specifice (de ex., bi-specifice) descrise în acest document, precum și metode pentru fabricarea respectivelor articole de fabricație.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1 prezintă curbele doză-răspuns ale anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144 pentru producerea de IFN- γ într-o analiză de reacție limfocitară mixtă (MLR) unidirecțională.

Figura 2 prezintă curbele doză-răspuns ale anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144 pentru producerea de TNF- α într-o analiză MLR unidirecțională.

Figura 3 prezintă efectul asupra subseturilor de celule dendritice purificate al anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144, măsurat ca niveluri de TNF- α utilizând analiza de citokină de electrochimiluminiscență pe Scala Meso.

Figura 4 prezintă legarea TIM-3-Fc la celule pozitive (apoptotice) la fosfatidilserină (PtdS) în prezența unui anticorp anti-TIM-3 din invenție precum și a unui anticorp anti-TIM-3 de control pozitiv și a doi anticorpi de control negativ. A: Anticorp anti-TIM-3 din invenție [15086.17145]; B: anticorp anti-TIM-3 neblocant de control negativ [15338.15338]; C: anticorp anti-TIM-3 de referință [18571.18571]; D: anticorp anti-PD-1 de control negativ Keytruda® (pembrolizumab).

Figura 5 prezintă curbele doză-răspuns a nouă anticorpi anti-TIM-3 pentru producerea de IFN- γ într-o analiză MLR unidirecțională.

Figura 6 prezintă curbele doză-răspuns a zece anticorpi anti-TIM-3 pentru producerea de IFN- γ într-o analiză MLR bidirecțională. Anticorpul 15086.17145 este arătat ca "15086."

Figura 7 prezintă curbele doză-răspuns a nouă anticorpi anti-TIM-3 pentru producerea de TNF- α în celule dendritice derivate din monocite de la doi donatori independenți.

Figura 8 prezintă o vedere de ansamblu a grupurilor de epitopi (binurilor de epitopi) identificate prin analiza competiției de legare a unui panou de optsprezece anticorpi anti-TIM-3. Anticorpii în formă de cerc conectați prin linii negre indică activitate de blocare încrucișată în ambele orientări. Anticorpii în formă de pătrat indică blocarea unidirecțională atunci când anticorpul este testat numai în soluție. Liniile întrerupte indică blocarea unidirecțională atunci când anticorpii sunt doar imobilizați. Anticorpii sunt grupați în conformitate cu șabloanele de competiție cu alți anticorpi anti-TIM-3. Anticorpul 15086.17145 este arătat ca "15086."

Figura 9 prezintă locațiile epitopilor de anticorpi pe structura domeniului TIM-3 IgV uman (PDB 5F71). O succesiune de imagini ale domeniului TIM-3 IgV uman este prezentată în trei orientări diferite și este

indicată locația situsului de legare la fosfatidilserină. Locațiile epitopilor mapați sunt prezentate în culori închise pe un model de umplere a spațiului TIM-3 pentru fiecare anticorp. Fragmentul Fab 15086 este arătat ca "15086" iar fragmentul Fab 20293 este arătat ca "20293."

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Prezenta invenție furnizează noi anticorpi anti-TIM-3 uman care pot fi utilizați pentru a îmbunătăți sistemul imunitar la un pacient uman, cum ar fi un pacient cu cancer. Dacă nu este declarat în alt fel, așa cum este utilizat în acest document, "TIM-3" se referă la TIM-3 uman. O secvență de polipeptidă TIM-3 umană este disponibilă sub numărul de acces Uniprot Q8TDQ0 (HAVR2_HUMAN), prezentată aici ca SECV ID NR: 236.

Termenul "anticorp" (Ab) sau "imunoglobulină" (Ig), așa cum este utilizat în acest document, se referă la un tetramer care cuprinde două lanțuri grele (H) (aproximativ 50-70 kDa) și două lanțuri ușoare (L) (aproximativ 25 kDa) inter-conectate prin legături de disulfură. Fiecare lanț greu este compus dintr-un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și o regiune constantă a lanțului greu (CH). Fiecare lanț ușor este compus dintr-un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) și o regiune constantă a lanțului ușor (CL). Domeniile VH și VL pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, denumite "regiuni de determinare a complementarității" (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, denumite "regiuni cadru" (FR). Fiecare VH și VL este compus din trei CDR (H-CDR desemnează în acest document o CDR din lanțul greu; iar L-CDR desemnează în acest document o CDR din lanțul ușor) și patru FR, dispuse de la capătul amino-terminal la capătul carboxil-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Atribuirea numerelor aminoacizilor în lanțul greu sau ușor poate fi în conformitate cu definițiile IMGT® (Lefranc și colab., Dev Comp Immunol, 27 (1): 55-77 (2003)); sau definițiile lui Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 și 1991)); Chothia și Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987); sau Chothia și colab., Nature, 342: 878-883 (1989).

Termenul "anticorp recombinant" se referă la un anticorp care este exprimat dintr-o celulă sau linie celulară cuprinzând secvența(e) de nucleotide care codifică anticorpul, unde secvența(e) de nucleotide nu este asociată (sunt asociate) în mod natural cu celula.

Termenul "proteină izolată", "polipeptidă izolată" sau "anticorp izolat" se referă la o proteină, o polipeptidă sau un anticorp care, în virtutea originii sale sau sursei de proveniență (1) nu este asociată/asociat cu componente asociate în mod natural care o/il însoțesc în starea sa nativă, (2) este liberă/liber de alte proteine din aceeași specie, (3) este exprimată/exprimat de o celulă dintr-o specie diferită, și/sau (4) nu se găsește în natură. Prin urmare, o polipeptidă care este sintetizată chimic sau sintetizată într-un sistem celular diferit de celula din care aceasta provine în mod natural va fi "izolată" de componentele sale asociate în mod natural. O proteină poate fi, de asemenea, făcută în mod substanțial liberă de componente asociate în mod natural prin izolare, utilizând tehnici de purificare a proteinelor binecunoscute în domeniul de specialitate.

Așa cum este utilizat în acest document, termenul "linie germinală" se referă la secvențele de nucleotide și aminoacizi ale genelor și segmentelor de gene de anticorpi pe măsură ce acestea sunt transmise de la părinți la descendenți prin intermediul celulelor germinale. Secvențele liniei germinale se disting de secvențele de nucleotide care codifică anticorpi în celulele B mature, care au fost alterate prin recombinare și evenimente de hipermutație în timpul maturizării celulelor B. Un anticorp care "utilizează" o secvență de linie germinală particulară are o secvență de nucleotide sau de aminoacizi care se aliniază cu acea secvență de nucleotide de linie germinală sau cu secvența de aminoacizi pe care o specifică mai îndeaproape decât cu orice altă secvență de nucleotide sau aminoacizi de linie germinală.

Termenul "afinitate" se referă la o măsură a atracției dintre un antigen și un anticorp. Atractivitatea intrinsecă a anticorpului pentru antigen este exprimată de obicei drept constanta de echilibru a afinității de legare (K_D) a unei interacțiuni anticorp-antigen particulare. Se spune că un anticorp se leagă în mod specific la un antigen atunci când K_D este ≤ 1 mM, preferabil ≤ 100 nM. O constantă A a afinității de legare K_D poate fi măsurată, de ex., prin rezonanța plasmonului de suprafață (BIAcore™) sau Interferometrie Bio-Layer, pentru exemplificare folosind sistemul SPR XPR36 ProteOn™ de la Bio-Rad sau sistemul Octet™.

Termenul " k_{off} " se referă la constanta vitezei de disociere a unei interacțiuni anticorp-antigen particulare. O constantă a vitezei de disociere k_{off} poate fi măsurată prin Interferometrie Bio-Layer, pentru exemplificare folosind sistemul Octet™.

Termenul "epitop", așa cum este utilizat în acest document, se referă la o porțiune (determinant) a unui antigen care se leagă în mod specific la un anticorp sau o moleculă înrudită, cum ar fi o moleculă de legare bispecifică. Determinanții epitopici constau, în general, din grupări de suprafață active din punct de vedere chimic de molecule cum ar fi aminoacizii sau carbohidrații sau lanțurile laterale de zahăr și au, în general, caracteristici structurale tri-dimensionale specifice, precum și caracteristici de sarcină specifice. Un epitop poate fi "liniar" sau "conformațional". Într-un epitop liniar, toate punctele de interacțiune dintre o proteină (de ex., un antigen) și o moleculă de interacțiune (cum ar fi un anticorp)

apar liniar de-a lungul secvenței primare de aminoacizi a proteinei. Într-un epitop conformațional, punctele de interacțiune apar peste reziduurile de aminoacizi pe proteină care sunt separate unul de celălalt în secvența primară de aminoacizi. Odată ce este determinat un epitop dorit pe un antigen, este posibil să se genereze anticorpi la acel epitop folosind tehnici binecunoscute în domeniul de specialitate.

5 Pentru exemplificare, un anticorp la un epitop liniar poate fi generat, de ex., prin imunizarea unui animal cu o peptidă având reziduurile de aminoacizi ale epitopului liniar. Un anticorp la un epitop conformațional poate fi generat, de ex., prin imunizarea unui animal cu un mini-domeniu care conține reziduurile relevante de aminoacizi ale epitopului conformațional. Un anticorp la un epitop particular poate fi generat, de asemenea, de ex., prin imunizarea unui animal cu molecula țintă de interes sau o

10 porțiune relevantă a acesteia (de ex., ECD al TIM-3), apoi screening-ul pentru legarea la epitop.

Se poate determina dacă un anticorp se leagă la același epitop ca, sau concurează pentru legare cu un anticorp anti-TIM-3 din invenție prin utilizarea metodelor cunoscute în domeniul de specialitate, incluzând, fără limitare, analize de competiție, binning-ul epitopilor, și scanarea cu alanină. Anticorpul de testat și un anticorp anti-TIM-3 din invenție se pot lega la cel puțin un reziduu comun (de ex., cel puțin

15 două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt sau nouă reziduuri comune) pe TIM-3. Reziduurile de contact pe TIM-3 pot fi complet identice între anticorpul de testat și anticorpul anti-TIM-3 din invenție. Se poate permite anticorpului anti-TIM-3 din invenție să se lege la TIM-3 în condiții de saturare și apoi se măsoară capacitatea anticorpului de testat de a se lega la TIM-3. Dacă anticorpul de testat este capabil să se lege la TIM-3 în același timp cu anticorpul anti-TIM-3 de referință, atunci anticorpul de testat se leagă la un

20 epitop diferit de anticorpul anti-TIM-3 de referință. Totuși, dacă anticorpul de testat nu este capabil să se lege la TIM-3 în același timp, atunci anticorpul de testat se leagă la același epitop, la un epitop suprapus, sau la un epitop care se află în imediata apropiere a epitopului legat de anticorpul anti-TIM-3 din invenție. Acest experiment poate fi efectuat folosind, de ex., ELISA, RIA, BIACORE™, Interferometrie Bio-Layer sau citometrie în flux. Pentru a testa dacă un anticorp anti-TIM-3 concurează încrucișat cu un alt anticorp

25 anti-TIM-3, se poate folosi metoda de competiție descrisă mai sus în două direcții, adică determinând dacă anticorpul cunoscut blochează anticorpul de testat și invers. Astfel de experimente de competiție încrucișată pot fi efectuate, de ex., folosind un instrument SPR IBIS MX96 sau sistemul Octet™.

În anumite cazuri poate fi de dorit să se altereze unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi din CDR în scopul de a îmbunătăți afinitatea de legare la epitopul țintă. Acest lucru este cunoscut ca

30 "maturarea de afinitate". În domeniul de specialitate sunt cunoscute diverse metode de maturare de afinitate, pentru exemplificare metoda de mutagenză de saturație de scanare *in vitro* descrisă de Burks și colab., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 412-417 (1997), și metoda de maturare de afinitate *in vitro* treptată a Wu și colab., Proc Natl Acad Sci USA, 95: 6037-6042 (1998).

Termenul "porțiune de legare la antigen" a unui anticorp (sau pur și simplu "porțiune de

35 anticorp"), așa cum este utilizat în acest document, se referă la una sau mai multe porțiuni sau fragmente ale unui anticorp care păstrează capacitatea de a se lega în mod specific la un antigen (de ex., TIM-3 uman, sau o porțiune a acestuia). A fost demonstrat faptul că anumite fragmente ale unui anticorp de lungime completă pot îndeplini funcția de legare la antigen a anticorpului. Exemplele de fragmente de legare cuprinse în cadrul termenului "porțiune de legare la antigen" includ (i) un fragment Fab: un

40 fragment monovalent alcătuit din domeniile V_L , V_H , C_L și C_H1 ; (ii) un fragment $F(ab')_2$: un fragment bivalent care cuprinde două fragmente Fab legate printr-o punte de disulfură în regiunea balama; (iii) un fragment Fd care constă din domenii V_H și C_H1 ; (iv) un fragment Fv care constă din domeniile V_L și V_H ale unui singur braț al unui anticorp, (v) un fragment dAb, care constă dintr-un domeniu V_H ; și (vi) o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR) capabilă să se lege în mod specific la un

45 antigen. Mai mult decât atât, deși cele două domenii ale fragmentului Fv, V_L și V_H , sunt codificate de gene separate, ele pot fi unite, folosind metode recombinante, de un linker sintetic care le permite să fie făcute ca un singur lanț proteic în care domeniile V_L și V_H se împerechează pentru a forma molecule monovalente (cunoscute ca Fv cu lanț unic (scFv)). De asemenea, în cadrul invenției sunt molecule de legare la antigen care cuprind un V_H și un V_L . În cazul unui V_H , molecula poate cuprinde, de asemenea,

50 una sau mai multe dintre o regiune CH1, balama, CH2, sau CH3. Se intenționează, de asemenea, ca astfel de anticorpi cu lanț unic să fie cuprinși în cadrul termenului "porțiune de legare la antigen" a unui anticorp. Sunt incluse, de asemenea, alte forme de anticorpi cu lanț unic, cum ar fi diacorpții. Diacorpții sunt anticorpi bivalenți, bispecifici, în care domeniile V_H și V_L sunt exprimate pe un singur lanț polipeptidic, dar folosind un linker care este prea scurt pentru a permite împerecherea între cele două

55 domenii de pe același lanț, forțând astfel domeniile să se împerecheze cu domenii complementare ale altui lanț și creând două situsuri de legare la antigen.

Porțiunile de anticorp, cum ar fi fragmentele Fab și $F(ab')_2$, pot fi preparate din anticorpi întregi folosind tehnici convenționale, cum ar fi digestia cu papaină sau pepsină a anticorpilor întregi. Mai mult, anticorpții, porțiunile de anticorpi și moleculele de imunoadeziune se pot obține utilizând tehnici de ADN recombinant standard, de ex., așa cum este descris în acest document.

60

Clasa (izotipul) și subclasa anticorpilor anti-TIM-3 pot fi determinate prin orice metodă cunoscută în domeniul de specialitate. În general, clasa și subclasa unui anticorp pot fi determinate folosind anticorpi care sunt specifici pentru o clasă și subclasă particulară de anticorpi. Astfel de anticorpi sunt disponibili în comerț. Clasa și subclasa pot fi determinate prin ELISA, Western Blot precum și prin alte tehnici. Alternativ, clasa și subclasa pot fi determinate prin secvențierea întregilor regiuni constante ale lanțurilor grele și/sau ușoare ale anticorpilor sau a unei porțiuni a regiunilor constante ale lanțurilor grele și/sau ușoare ale anticorpilor, compararea secvențelor de aminoacizi cu secvențele de aminoacizi cunoscute ale diferitelor clase și subclase de imunoglobuline, și determinarea clasei și subclasei anticorpilor.

Atunci când se face referire la reziduuri de aminoacizi particulare într-o poziție dată a unei secvențe de anticorp, o indicație de, de ex., "35S" se referă la poziție și reziduu, adică, în acest caz indică faptul că un reziduu de serină (S) este prezent în poziția 35 a secvenței. În mod similar, o indicație de, de ex., "13Q+35S" se referă la cele două reziduuri în pozițiile respective.

Dacă nu este indicat în alt fel, toate numerele de reziduuri de aminoacizi de anticorpi la care se face referire în această descriere a invenției sunt cele din schema de numerotare IMGT®.

Anticorpi anti-TIM-3

Prezenta invenție furnizează anticorpi direcționați împotriva TIM-3, și porțiuni de legare la antigen ale acestora, așa cum se definește în revendicări. Într-o variantă particulară de realizare, anticorpii sunt anticorpi umani generați de la șobolani transgenici care sunt capabili să genereze anticorpi cu idiotipuri umane.

Un avantaj al noilor anticorpi anti-TIM-3 din invenție este că ei pot activa puternic celulele dendritice (a se vedea, de ex., Exemplul 4). Deși nu se dorește să fie legat de nicio teorie particulară, se crede că anticorpii anti-TIM-3 din invenție sunt capabili să stimuleze celulele T (de ex., celulele T specifice tumorii) prin activarea celulelor dendritice. Mai mult decât atât, prezenta cerere de brevet demonstrează pentru prima dată că anticorpii anti-TIM-3 de izotip IgG1 sau IgG2 au niveluri ridicate de activitate în timp ce anticorpii de izotip IgG4 sau IgG1 - LALA sunt non-funcționali sau slab funcționali (a se vedea, de ex., Exemplele 3 și 4). Fără a dori să fie legate de vreo teorie particulară, datele inventatorilor sugerează că un anticorp anti-TIM-3 care poate lega încrucișat TIM-3 prin intermediul receptorilor Fc este un activator deosebit de puternic al sistemului imunitar. Pentru exemplificare, un anticorp anti-TIM-3 IgG2 din invenție se poate lega la FcγR2A găsit pe celulele dendritice, și se crede că activează celulele dendritice prin reticularea moleculelor TIM-3 de pe acestea.

Anticorpii anti-TIM-3 făcuți cunoscuți în acest document pot fi menționați fie printr-un număr de 5 cifre, de ex. "20131", fie printr-un număr din 10 cifre, de ex. "15086.16837". Numerele din 10 cifre cu aceleași prime cinci cifre sunt derivate din același anticorp părinte, ca în cazul anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144. Este de așteptat ca astfel de anticorpi, care partajează aceleași șase CDR-uri, să aibă aceleași, sau în mod substanțial aceleași proprietăți de legare la țintă. Așa cum va fi evident din secvențele de proteine și ADN furnizate în acest document, variantele 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144 au doar o singură diferență de aminoacizi în secvența VH în comparație cu anticorpul 15086 părinte ("15086.15086"), și anume E, mai degrabă decât Q, în poziția 6, în timp ce secvențele de aminoacizi VL sunt identice. De asemenea, va fi evident că aceste variante diferă în primul rând prin formatul/subclasa lor de anticorpi, adică:

15086.15086: IgG1

15086.16837: IgG1 LALA

15086.17145: IgG2

15086.17144: IgG4

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 7-9, respectiv;

b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3;

c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3;

d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 3 și 5;

e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 10-12, respectiv;

f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4;

g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4;

h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6;

i) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4;

În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 este selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 7-12, respectiv;
 b) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4; și
 5 c) un anticorp al cărui HC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 3 și 5; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 7-9, respectiv;
 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu
 10 secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15;
 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15;
 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și 25;
 e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 10-12, respectiv;
 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu
 15 secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4;
 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4;
 h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6;
 i) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID
 NR: 15 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR:
 20 4;

În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 este selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 7-12, respectiv;
 25 b) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4; și
 c) un anticorp al cărui HC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 7-9, respectiv;
 30 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15;
 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15;
 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și secvența
 35 de aminoacizi din SECV ID NR: 23 sau 24;
 e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 10-12, respectiv;
 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4;
 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4;
 40 h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6;
 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR:
 4;

În unele variante de realizare, anticorpul anti-TIM-3 este selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 7-12, respectiv;
 b) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4; și
 50 c) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 23 sau 24; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 30-32, respectiv;
 55 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28;
 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28;
 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 28 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
 60 e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 33-35, respectiv;

- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 29;
- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 29;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 29 și 6;
- 5 i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 30-35, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 29;
- 10 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 29; și
- l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 28 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 29 și 6.
- 15 În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:
- a) un anticorp al cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 40-42, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38;
- 20 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 38 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp al cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 43-45, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 39;
- 25 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 39;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 39 și 6;
- i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 40-45, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 39;
- 30 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 39; și
- l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 39 și 6.
- 35 În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:
- a) un anticorp al cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 50-52, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 48;
- 40 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 48;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 48 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp al cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 53-55, respectiv;
- 45 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 49;
- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 49;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 49 și 6;
- i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 50-55, respectiv;
- 50 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 48 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 49;
- k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 48 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 49; și
- 55 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 48 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 49 și 6.
- 60 În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:
- a) un anticorp al cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 60-62, respectiv;

b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 58;

c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 58;

5 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 58 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;

e) un anticorp al cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 63-65, respectiv;

f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 59;

g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 59;

10 h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 59 și 6;

i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 60-65, respectiv;

j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 58 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 59;

15 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 58 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 59; și

l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 58 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 59 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

a) un anticorp al cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 70-72, respectiv;

b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 68;

25 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 68;

d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 68 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;

e) un anticorp al cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 73-75, respectiv;

30 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 69;

g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 69;

h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 69 și 6;

i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 70-75, respectiv;

35 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 68 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 69;

k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 68 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 69; și

40 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 68 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 69 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

a) un anticorp al cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 80-82, respectiv;

45 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 78;

c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 78;

d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 78 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;

50 e) un anticorp al cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 83-85, respectiv;

f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 79;

g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 79;

h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 79 și 6;

55 i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 80-85, respectiv;

j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 78 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 79;

60 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 78 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 79; și

l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 78 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 79 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- 5 a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 90-92, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 88;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 88;
- 10 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 88 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 93-95, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 89;
- 15 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 89;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 89 și 6;
- i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 90-95, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 88 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 89;
- 20 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 88 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 89; și
- l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 88 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 89 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 100-102, respectiv;
- 30 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 98;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 98;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 98 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- 35 e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 103-105, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 99;
- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 99;
- 40 h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 99 și 6;
- i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 100-105, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 98 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 99;
- 45 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 98 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 99; și
- l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 98 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 99 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 110-112, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 108;
- 55 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 108;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 108 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 113-115, respectiv;
- 60 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 109;

- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 109;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 109 și 6;
- i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 110-115, respectiv;
- 5 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 108 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 109;
- k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 108 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 109; și
- 10 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 108 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 109 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- 15 a) un anticorp al cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 120-122, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 118;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 118;
- 20 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 118 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp al cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 123-125, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 119;
- 25 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 119;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 119 și 6;
- i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 120-125, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 118 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 119;
- 30 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 118 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 119; și
- l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 118 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 119 și 6.
- 35

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp al cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 130-132, respectiv;
- 40 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 128;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 128;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 128 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- 45 e) un anticorp al cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 133-135, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 129;
- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 129;
- 50 h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 129 și 6;
- i) un anticorp al cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 130-135, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 128 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 129;
- 55 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 128 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 129; și
- l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 128 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 129 și 6.
- 60

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 140-142, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 138;
- 5 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 138;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 138 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 143-145, respectiv;
- 10 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 139;
- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 139;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 139 și 6;
- i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 140-
- 15 145, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 138 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 139;
- k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 138 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 139; și
- 20 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 138 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 139 și 6.

În acest document este descris an anticorpu anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 150-152, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 148;
- 30 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 148;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 148 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 153-155, respectiv;
- 35 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 149;
- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 149;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 149 și 6;
- i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 150-
- 40 155, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 148 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 149;
- k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 148 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 149; și
- 45 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 148 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 149 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 160-162, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 158;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 158;
- 55 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 158 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 163-165, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 159;
- 60 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 159;

- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 159 și 6;
 i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 160-165, respectiv;
 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 158 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 159;
 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 158 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 159; și
 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 158 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 159 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 170-172, respectiv;
 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 168;
 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 168;
 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 168 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
 e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 173-175, respectiv;
 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 169;
 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 169;
 h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 169 și 6;
 i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 170-175, respectiv;
 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 168 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 169;
 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 168 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 169; și
 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 168 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 169 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 180-182, respectiv;
 b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 178;
 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 178;
 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 178 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
 e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 183-185, respectiv;
 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 179;
 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 179;
 h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 179 și 6;
 i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 180-185, respectiv;
 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 178 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 179;
 k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 178 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 179; și
 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 178 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 179 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

- a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 190-192, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 188;
- 5 c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 188;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 188 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 193-195, respectiv;
- 10 f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 189;
- g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 189;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 189 și 6;
- i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 190-
- 15 195, respectiv;
- j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 188 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 189;
- k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 188 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 189; și
- 20 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 188 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 189 și 6.
- În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:
- 25 a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 200-202, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 198;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 198;
- 30 d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 198 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 203-205, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 199;
- 35 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 199;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 199 și 6;
- i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 200-205, respectiv;
- 40 j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 198 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 199;
- k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 198 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 199; și
- 45 l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 198 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 199 și 6.
- În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:
- 50 a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 210-212, respectiv;
- b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 208;
- c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 208;
- d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 208 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;
- 55 e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 213-215, respectiv;
- f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 209;
- 60 g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 209;
- h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 209 și 6;

i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 210-215, respectiv;

j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 208 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 209;

k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 208 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 209; și

l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 208 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 209 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 220-222, respectiv;

b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 218;

c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 218;

d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 218 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;

e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 223-225, respectiv;

f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 219;

g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 219;

h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 219 și 6;

i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 220-225, respectiv;

j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 218 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 219;

k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 218 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 219; și

l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 218 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 219 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 selectat din grupul care este constituit din:

a) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 230-232, respectiv;

b) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului greu (VH) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 228;

c) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 228;

d) un anticorp al cărui lanț greu (HC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 228 și SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25;

e) un anticorp ale cărui L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 233-235, respectiv;

f) un anticorp al cărui domeniu variabil al lanțului ușor (VL) este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 229;

g) un anticorp al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 229;

h) un anticorp al cărui lanț ușor (LC) cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 229 și 6;

i) un anticorp ale cărui H-CDR1-3 și L-CDR1-3 cuprind secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 230-235, respectiv;

j) un anticorp al cărui VH este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 228 și al cărui VL este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 229;

k) un anticorp al cărui VH cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 228 și al cărui VL cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 229; și

l) un anticorp al cărui HC cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 228 și secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5, 23, 24, sau 25; și al cărui LC cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 229 și 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, care concurează pentru legarea la TIM-3 uman cu, sau care se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca, anticorpul 15086.15086 având formatul IgG1, anticorpul 15086.16837 având formatul IgG1

LALA, anticorpu 15086.17145 având formatul IgG2, sau anticorpu 15086.17144 având formatul IgG4. În unele variante de realizare, anticorpu din invenție este o IgG. În unele variante de realizare, anticorpu din invenție are un format IgG1, IgG2, IgG3, sau IgG4.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, care concurează pentru legarea la TIM-3 uman cu, sau care se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca, anticorpu 20131, 20293, 15105, 15107, 15109, 15174, 15175, 15260, 15284, 15299, 15353, 15354, 17244, 17245, 19324, 19416, 19568, 20185, 20300, 20362, sau 20621. În unele variante de realizare, anticorpu din invenție are un format IgG1, IgG2, IgG3, sau IgG4.

Anticorpu anti-TIM-3 din invenție, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, nu concurează pentru legarea la TIM-3 uman cu, sau se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca, oricare sau toți anticorpii din bin-ul 1 de epitopi (anticorp de referință mAb 15), bin-ul 2 (de ex., anticorpii 15105 și 15107), și bin-ul 8 (de ex., anticorpii 15174 și 15175), așa cum este definit în Exemplul 12 de mai jos.

Anticorpu anti-TIM-3 din invenție, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, nu concurează pentru legarea la TIM-3 uman cu, sau se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca, oricare sau toți anticorpii din bin-ul 2 de epitopi (de ex., anticorpii 15105 și 15107) și bin-ul 8 (de ex., anticorpii 15174 și 15175), așa cum este definit în Exemplul 12 de mai jos.

Anticorpu anti-TIM-3 din invenție, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, nu concurează pentru legarea la TIM-3 uman cu, sau se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca, oricare sau toți anticorpii din bin-ul 2 de epitopi (de ex., anticorpii 15105 și 15107), așa cum este definit în Exemplul 12 de mai jos.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care concurează pentru legarea la TIM-3 uman sau se leagă la același epitop al TIM-3 uman ca un anticorp ale cărui CDR1-3 de lanț greu (H) și CDR1-3 de lanț ușor (L) cuprind, respectiv, SECV ID NRs: 7-12, 30-35, 40-45, 50-55, 60-65, 70-75, 80-85, 90-95, 100-105, 110-115, 120-125, 130-135, 140-145, 150-155, 160-165, 170-175, 180-185, 190-195, 200-205, 210-215, 220-225, sau 230-235.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen care are un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care este cel puțin 90% identic în secvență cu SECV ID NR: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228, de ex., cel puțin 95% identic, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identic cu respectiva secvență.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care este cel puțin 90% identic în secvență cu SECV ID NR: 3, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228, de ex. cel puțin 95% identic, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identic cu respectiva secvență; și o regiune constantă a lanțului greu (CH) care este cel puțin 90% identică în secvență cu SECV ID NR: 5, de ex. cel puțin 95% identică, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu SECV ID NR: 5.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un lanț greu (HC) care cuprinde secvența de aminoacizi VH din SECV ID NR: 3, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228 și secvența de aminoacizi CH din SECV ID NR: 5.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care este cel puțin 90% identic în secvență cu SECV ID NR: 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228, de ex. cel puțin 95% identic, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identic cu respectiva secvență; și o regiune constantă a lanțului greu (CH) care este cel puțin 90% identică în secvență cu SECV ID NR: 23, 24 sau 25, de ex. cel puțin 95% identică, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu SECV ID NR: 23, 24 sau 25. În variante particulare de realizare, CH este cel puțin 90% identic în secvență cu SECV ID NR: 25, de ex. cel puțin 95% identică, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu SECV ID NR: 25.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un lanț greu (HC) care cuprinde secvența de aminoacizi VH din SECV ID NR: 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, sau 228 și secvența de aminoacizi CH din SECV ID NR: 23, 24 sau 25. Lanțul greu poate cuprinde secvența de aminoacizi CH din SECV ID NR: 25.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi VL din SECV ID NR: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229, de ex. cel puțin 95% identic, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identic cu respectiva secvență.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care este cel puțin 90% identic în secvență cu secvența de aminoacizi VL din SECV ID NR: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229, de ex.

cel puțin 95% identic, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identic cu respectiva secvență, și o regiune constantă a lanțului ușor (CL) care este cel puțin 90% identică în secvență cu SECV ID NR: 6, de ex. cel puțin 95% identică, cum ar fi cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu SECV ID NR: 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care are un lanț ușor (LC) care cuprinde secvența de aminoacizi VL din SECV ID NR: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, sau 229 și secvența de aminoacizi CL din SECV ID NR: 6.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3 care cuprinde oricare dintre lanțurile grele descrise mai sus și oricare dintre lanțurile ușoare descrise mai sus.

Oricare dintre anticorpilor anti-TIM-3 sau porțiunile de legare la antigen descrise în acest document poate inhiba legarea liganzilor cum ar fi galectina-9, CEACAM1, HMGB-1, și fosfatidilserina la TIM-3.

Într-o variantă de realizare, administrarea unui anticorp anti-TIM-3 din invenție sau a unei porțiuni de legare la antigen a acestuia poate activa celulele dendritice, cauzând maturarea acestora și prin urmare capacitatea lor de a stimula celulele T. Deși nu se dorește să fie legat de nicio teorie particulară, se crede că anticorpilor anti-TIM-3 din invenție funcționează ca activatori ai celulelor dendritice TIM-3, prin care efectul lor asupra celulelor dendritice servește la stimularea celulelor T. Într-o configurație legată de tumoră, anticorpilor anti-TIM-3 ar provoca în acest fel maturarea și activarea celulelor dendritice asociate tumorii, rezultând activarea celulelor T specifice tumorii.

În unele variante de realizare, oricare dintre anticorpilor anti-TIM-3 sau porțiunile de legare la antigen, așa cum sunt definite în revendicări, se pot lega la TIM-3 uman cu o K_D de cel puțin 100, cel puțin 50, cel puțin 40, cel puțin 30, cel puțin 25, cel puțin 20, cel puțin 15, cel puțin 10, cel puțin 9, cel puțin 8, cel puțin 7, sau cel puțin 6 nM. În anumite variante de realizare, K_D este determinată folosind rezonanța plasmonului de suprafață.

În unele variante de realizare, oricare dintre anticorpilor anti-TIM-3 sau porțiunile de legare la antigen, așa cum sunt definite în revendicări, se pot lega la TIM-3 de cynomolgus cu o K_D de cel puțin 100, cel puțin 50, cel puțin 40, cel puțin 30, cel puțin 25, cel puțin 24, cel puțin 23, cel puțin 22, cel puțin 21, sau cel puțin 20 nM. În anumite variante de realizare, K_D este determinată folosind rezonanța plasmonului de suprafață.

În unele variante de realizare, oricare dintre anticorpilor anti-TIM-3 sau porțiunile de legare la antigen, așa cum sunt definite în revendicări, pot avea o aviditate pentru TIM-3 uman cu $EC_{50} \leq 2, 1,5, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$, sau $0,15$ nM. În unele variante de realizare, oricare dintre anticorpilor anti-TIM-3 sau porțiunile de legare la antigen, așa cum sunt definite în revendicări, pot avea o aviditate pentru TIM-3 de cynomolgus cu $EC_{50} \leq 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$, sau $0,15$ nM.

Într-o variantă de realizare, administrarea unui anticorp anti-TIM-3 din invenție sau a unei porțiuni de legare la antigen a acestuia poate activa în mod direct celulele T.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, care se leagă la un epitop al TIM-3 care include cel puțin unul (de ex., cel puțin unul, cel puțin doi, cel puțin trei, cel puțin patru, cel puțin cinci, cel puțin șase, cel puțin șapte, cel puțin opt, sau cel puțin nouă) dintre următoarele reziduuri cu SECV ID NR: 236: P50, V60, F61, E62, G64, R69, I117, M118, și D120. Un epitop cu orice combinație a celor de mai sus.

Un anticorp anti-TIM-3 din invenție, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, se leagă la un epitop al TIM-3 care include următoarele reziduuri cu SECV ID NR: 236: P50, V60, F61, E62, G64, R69, I117, M118, și D120.

În acest document este descris un anticorp anti-TIM-3, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, care se leagă la un epitop al TIM-3 care cuprinde reziduurile 62-67 și/sau 114-117 din SECV ID NR: 236. Anticorpul sau porțiunea se leagă la reziduurile 62-67 (sau un fragment al acestora, cum ar fi un fragment de unul, două, trei, patru sau cinci reziduuri), din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, și 20293). În acest document este descris un anticorp sau o porțiune care se leagă la reziduurile 114-117 (sau un fragment al acestora, cum ar fi un fragment de unul, două, sau trei reziduuri) din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpul 20131). Este avut în vedere, de asemenea, un epitop cu orice combinație din reziduurile de mai sus.

Un anticorp anti-TIM-3 din invenție, sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, se leagă la un epitop al TIM-3 care cuprinde reziduurile 62-67 din SECV ID NR: 236. Anticorpul sau porțiunea se leagă la reziduurile 62-67 din SECV ID NR: 236 (de ex., anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, și 20293).

Clasa unui anticorp anti-TIM-3 obținut prin metodele descrise în acest document poate fi modificată sau schimbată cu o altă clasă sau subclasă. Într-un aspect al invenției, o moleculă de acid nucleic care codifică VL sau VH este izolată folosind metode binecunoscute în domeniul de specialitate, astfel încât aceasta nu include secvențe de acid nucleic care codifică CL sau CH. Moleculele de acid

nucleic care codifică VL sau VH sunt apoi legate operativ la o secvență de acid nucleic care codifică un CL sau CH, respectiv, dintr-o clasă diferită de moleculă de imunoglobulină. Acest lucru poate fi obținut folosind un vector sau o moleculă de acid nucleic care cuprinde un lanț CL sau CH, așa cum este descris mai sus. Pentru exemplificare, un anticorp anti-TIM-3 care a fost inițial IgM poate fi schimbat ca clasă la IgG. Mai mult decât atât, schimbarea clasei poate fi utilizată pentru a converti o subclasă de IgG în alta, de ex., de la IgG1 la IgG2. O regiune constantă a lanțului ușor κ poate fi schimbată într-o regiune constantă a lanțului ușor λ . O metodă preferată pentru producerea unui anticorp din invenție cu un izotip de Ig dorit cuprinde etapele de izolare a unei molecule de acid nucleic care codifică lanțul greu al unui anticorp anti-TIM-3 și a unei molecule de acid nucleic care codifică lanțul ușor al unui anticorp anti-TIM-3, obținere a domeniului variabil al lanțului greu, ligatură a domeniului variabil al lanțului greu cu regiunea constantă a unui lanț greu al izotipului dorit, exprimare a lanțului ușor și lanțului greu ligaturat într-o celulă, și colectare a anticorpului anti-TIM-3 cu izotipul dorit.

Anticorpul anti-TIM-3 din invenție poate fi o moleculă IgG, IgM, IgE, IgA, sau IgD, dar este, în mod obișnuit, de izotip IgG, de ex. din subclasa IgG IgG1, IgG2a sau IgG2b, IgG3 sau IgG4. Într-o variantă de realizare, anticorpul este o IgG1. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul este o IgG2.

Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIM-3 poate cuprinde cel puțin o mutație în regiunea Fc. Este cunoscut un număr de mutații Fc diferite, unde aceste mutații asigură o funcție efectoare modificată. Pentru exemplificare, în multe cazuri va fi de dorit să se reducă sau să se elimine funcția efectoare, de ex., în cazul în care interacțiunile ligand/receptor sunt nedorite sau în cazul conjugatilor anticorp-medicament. Pozițiile de aminoacizi din regiunea Fc care pot fi avantajoase să sufere mutație pentru a reduce funcția efectoare includ una sau mai multe dintre pozițiile 228, 233, 234 și 235, unde pozițiile de aminoacizi sunt numerotate în conformitate cu schema de numerotare IMGT®.

Într-o variantă de realizare, unul sau ambele reziduuri de aminoacizi la pozițiile 234 și 235 pot suferi mutație, pentru exemplificare, de la Leu la Ala (L234A/L235A). Aceste mutații reduc funcția efectoare a regiunii Fc a anticorpilor IgG1. Suplimentar sau alternativ, reziduul de aminoacid la poziția 228 poate suferi mutație, pentru exemplificare la Pro. Într-o altă variantă de realizare, reziduul de aminoacid la poziția 233 poate suferi mutație, de ex., la Pro, reziduul de aminoacid la poziția 234 poate suferi mutație, de ex., la Val, și/sau reziduul de aminoacid la poziția 235 poate suferi mutație, de ex., la Ala. Pozițiile de aminoacizi sunt numerotate în conformitate cu schema de numerotare IMGT®.

Într-o altă variantă de realizare, în care anticorpul este din subclasa IgG4, acesta poate cuprinde mutația S228P, adică având o prolină în poziția 228, unde poziția aminoacidului este numerotată în conformitate cu schema de numerotare Eu IMGT®. Se știe că această mutație reduce schimbul nedorit de brațe Fab (Angal și colab., Mol Immunol., 30: 105-8 (1993)).

În anumite variante de realizare, un anticorp sau o porțiune de legare la antigen a acestuia din invenție poate face parte dintr-o moleculă de imunoadeziune mai mare, formată prin asocierea covalentă sau necovalentă a anticorpului sau porțiunii de anticorp cu una sau mai multe alte proteine sau peptide. Exemplele de astfel de molecule de imunoaderență includ utilizarea regiunii de nucleu de streptavidină pentru a face o moleculă scFv tetramerică (Kipriyanov și colab., Human Antibodies and Hybridomas, 6: 93-101 (1995)) și utilizarea unui reziduu de cisteină, a unei peptide marker și a unei etichete de polihistidină C-terminală pentru a face molecule scFv bivalente și biotilate (Kipriyanov și colab., Mol. Immunol., 31: 1047-1058 (1994)). Alte exemple includ cazurile în care CDR-urile dintr-un anticorp sunt încorporate într-o moleculă fie covalent, fie necovalent pentru a face din aceasta o imunoadezină care se leagă în mod specific la un antigen de interes. În astfel de variante de realizare, CDR poate fi încorporată (CDR-urile pot fi încorporate) ca parte a unui lanț polipeptidic mai mare, poate fi legată (pot fi legate) covalent la un alt lanț polipeptidic, sau poate fi încorporată (pot fi încorporate) necovalent.

Într-o altă variantă de realizare se poate produce un anticorp de fuziune sau imunoadezină care cuprinde tot anticorpul anti-TIM-3 sau o porțiune dintr-un anticorp anti-TIM-3 din invenție legată la o altă polipeptidă. În anumite variante de realizare, numai domeniile variabile ale anticorpului anti-TIM-3 sunt legate la polipeptidă. În anumite variante de realizare, domeniul VH al unui anticorp anti-TIM-3 este legat la o primă polipeptidă, în timp ce domeniul VL al unui anticorp anti-TIM-3 este legat la o a doua polipeptidă care se asociază cu prima polipeptidă într-o manieră astfel încât domeniile VH și VL pot interacționa unul cu celălalt pentru a forma un situs de legare la antigen. Într-o altă variantă preferată de realizare, domeniul VH este separat de domeniul VL de un linker astfel încât domeniile VH și VL pot interacționa unul cu altul (de ex., anticorpi cu un singur lanț). Anticorpul VH-linker-VL este apoi legat la polipeptida de interes. În plus, pot fi creați anticorpi de fuziune în care doi (sau mai mulți) anticorpi cu lanț unic sunt legați unul de altul. Acest lucru este util dacă se dorește să se creeze un anticorp divalent sau polivalent pe un singur lanț polipeptidic, sau dacă se dorește să se creeze un anticorp bispecific.

Pentru a crea un anticorp cu un singur lanț (scFv), fragmentele de ADN care codifică VH și VL sunt legate operativ la alt fragment care codifică un linker flexibil, de ex., care codifică secvența de aminoacizi (Gly4 -Ser)3 (SECV ID NR: 240), astfel încât secvențele VH și VL pot fi exprimate ca o proteină cu un singur lanț continuă, cu domeniile VL și VH unite de linkerul flexibil. A se vedea, de ex.,

Bird și colab., Science, 242: 423-426 (1988); Huston și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988); și McCafferty și colab., Nature, 348: 552-554 (1990). Anticorpul cu un singur lanț poate fi monovalent, dacă doar un singur VH și VL sunt utilizate; bivalent, dacă două VH și VL sunt utilizate; sau polivalent, dacă mai mult de două VH și VL sunt utilizate. Pot fi generați anticorpi bispecfici sau polivalenți care se leagă în mod specific la TIM-3 uman și la o altă moleculă, de exemplu.

În alte variante de realizare, pot fi preparați alți anticorpi modificați, utilizând molecule de acid nucleic care codifică anticorpul anti-TIM-3. De exemplu, folosind tehnici biologice moleculare standard, urmând învățăturile din descrierea invenției, se pot prepara "corpi kappa" (Ill și colab., Protein Eng., 10: 949-57 (1997)), "minicorpi" (Martin și colab., EMBO J., 13: 5303-9 (1994)), "diacorpi" (Holliger și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)), sau "Janusins" (Traunecker și colab., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) și Traunecker și colab., Int. J. Cancer (Suppl.), 7: 51-52 (1992)).

Un anticorp anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen din invenție se poate derivatiza sau lega la o altă moleculă (de ex., o altă peptidă sau proteină). În general, anticorpii sau porțiunile acestora sunt derivatizate astfel încât legarea TIM-3 nu este afectată în mod negativ de derivatizare sau etichetare. În consecință, se intenționează ca anticorpii și porțiunile de anticorp din invenție să includă atât formele intacte, cât și cele modificate ale anticorpilor umani anti-TIM-3, așa cum se definește în revendicări. Pentru exemplificare, un anticorp sau o porțiune de anticorp din invenție poate fi legat funcțional (prin cuplare chimică, fuziune genetică, asociere necovalentă sau în alt fel) la una sau mai multe alte entități moleculare, cum ar fi un alt anticorp (de ex., un anticorp bispecific sau un diacorp), un agent de detectare, un agent farmaceutic, și/sau o proteină sau peptidă care poate media asocierea anticorpului sau a porțiunii de anticorp cu o altă moleculă (cum ar fi o regiune de nucleu de streptavidină sau o etichetă de polihistidină).

Un tip de anticorp derivatizat este produs prin reticularea a doi sau mai mulți anticorpi (de același tip sau de tipuri diferite, de ex., pentru a crea anticorpi bispecfici). Agenții de reticulare adecvați îi includ pe cei care sunt heterobifuncționali, având două grupări reactive distincte separate printr-un distanțier adecvat (de ex., ester de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidă) sau homobifuncționali (de ex., suberat de disuccinimidil). Astfel de linkeri sunt disponibili, de ex., de la Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Un anticorp anti-TIM-3 poate fi derivatizat, de asemenea, cu o grupare chimică cum ar fi polietilen glicolul (PEG), o grupare metil sau etil, sau o grupare carbohidrat. Aceste grupări pot fi utile pentru a îmbunătăți caracteristicile biologice ale anticorpului, de ex., pentru a crește timpul de înjumătățire în ser.

Un anticorp conform prezentei invenții poate fi, de asemenea, etichetat. Așa cum sunt utilizați în acest document, termenii "etichetă" sau "etichetat" se referă la încorporarea altei molecule în anticorp. Într-o variantă de realizare, eticheta este un marker detectabil, de ex., încorporarea unui aminoacid radio-etichetat sau atașarea la o polipeptidă a porțiunilor de biotină care pot fi detectate prin avidină marcată (de ex., streptavidină care conține un marker fluorescent sau activitate enzimatică care poate fi detectată prin metode optice sau colorimetrice). Într-o altă variantă de realizare, eticheta sau markerul poate fi terapeutic, de ex., un conjugat de medicament sau toxină. În domeniul de specialitate sunt cunoscute și pot fi utilizate diferite metode de etichetare a polipeptidelor și glicoproteinelor. Exemplele de etichete pentru polipeptide includ, dar nu se limitează la, următoarele: radioizotopi sau radionuclizi (de ex., ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), etichete fluorescente (de ex., FITC, rodamină, fosfori de lantanide), etichete enzimatică (de ex., peroxidază de hrean, β-galactozidază, luciferază, fosfatază alcalină), markeri chimioluminescenți, grupări biotină, epitopi polipeptidici predeterminați recunoscuți de un reporter secundar (de ex., secvențe de perechi de feromorf de leucină, situsuri de legare pentru anticorpi secundari, domenii de legare a metalelor, etichete de epitop), agenți magnetici, cum ar fi chelații de gadolinu, toxine cum ar fi precum toxină pertussis, taxol, citocalazina B, gramicidină D, bromură de etidiu, emetină, mitomicină, etopozid, tenopozid, vincristină, vinblastină, colchicină, doxorubicină, daunorubicină, dihidroxi antracina dionă, mitoxantronă, mitramicină, actinomicină D, 1-dehidrotestosteron, glucocorticoizi, procaină, tetracaină, lidocaină, propranolol, și puromicina și analogi sau omologi ai acestora. În unele variante de realizare, etichetele sunt atașate de brațe distanțiere de diferite lungimi pentru a reduce obstacolul steric potențial.

În anumite variante de realizare, anticorpii din invenție pot fi prezenți într-o formă neutră (inclusiv formele zwitterionice) sau ca o specie încărcată pozitiv sau negativ. În unele variante de realizare, anticorpii pot fi complexați cu un contraion pentru a forma o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

Termenul "sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic" se referă la un complex care cuprinde unul sau mai mulți anticorpi și unul sau mai mulți contraioni, unde contraionii sunt derivați din acizi anorganici și organici acceptabili din punct de vedere farmaceutic și baze anorganice și organice acceptabile din punct de vedere farmaceutic.

Molecule de legare bispecifice

Într-un aspect suplimentar, invenția furnizează o moleculă de legare bispecifică având specificitatea de legare a unui anticorp anti-TIM-3 așa cum este definit în revendicări și specificitatea de legare a altui anticorp anti-TIM-3 (de ex., alt anticorp anti-TIM-3 descris în acest document) sau un anticorp care țintește o proteină diferită, cum ar fi o altă proteină de tip punct de control imun, un antigen de cancer, sau o altă moleculă de suprafață celulară a cărei activitate mediază o stare de boală cum ar fi cancerul. Astfel de molecule de legare bispecifică sunt cunoscute în domeniul de specialitate, iar exemple de diferite tipuri de molecule de legare bispecifice sunt date în altă parte în acest document.

Molecule de acid nucleic și vectori

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic și secvențe care codifică anticorpi anti-TIM-3 sau porțiuni de legare la antigen ale acestora, așa cum sunt definite în revendicări. În unele variante de realizare, diferite molecule de acid nucleic codifică secvențele de aminoacizi ale lanțului greu și lanțului ușor ale anticorpului anti-TIM-3 sau ale unei porțiuni de legare la antigen a acestuia. În alte variante de realizare, aceeași moleculă de acid nucleic codifică secvențele de aminoacizi ale lanțului greu și lanțului ușor ale anticorpului anti-TIM-3 sau ale unei porțiuni de legare la antigen a acestuia.

O referire la o secvență de nucleotide cuprinde complementul acesteia, cu excepția cazului în care se specifică în alt fel. Prin urmare, o referire la un acid nucleic având o secvență particulară ar trebui să fie înțeleasă că cuprinde lanțul său complementar, cu secvența sa complementară. Termenul "polinucleotidă", așa cum este menționat în acest document, înseamnă o formă polimerică de nucleotide de cel puțin 10 baze în lungime, fie ribonucleotide, fie deoxinucleotide, fie o formă modificată de orice tip de nucleotide. Termenul include forme mono-catenare și dublu-catenare.

În acest document sunt descrise secvențe de nucleotide care sunt cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% sau 99% identice cu una sau mai multe secvențe de nucleotide enumerate în acest document, de ex., cu o secvență de nucleotide care codifică o secvență de aminoacizi selectată din grupul care este constituit din SECV ID NRs: 3, 4, 7-12, 15, 28-35, 38-45, 48-55, 58-65, 68-75, 78-85, 88-95, 98-105, 108-115, 118-125, 128-135, 138-145, 148-155, 158-165, 168-175, 178-185, 188-195, 198-205, 208-215, 218-225, și 228-235. Termenul "identitate procentuală de secvență" în contextul secvențelor de acid nucleic se referă la reziduurile din două secvențe care sunt aceleași atunci când sunt aliniate pentru o corespondență maximă. Lungimea comparației de identitate a secvenței poate fi pe o întindere de cel puțin aproximativ nouă nucleotide, de obicei cel puțin aproximativ 18 nucleotide, mai de obicei cel puțin aproximativ 24 de nucleotide, de obicei cel puțin aproximativ 28 de nucleotide, mai tipic cel puțin aproximativ 32 de nucleotide și, de preferință, cel puțin aproximativ 36, 48 sau mai multe nucleotide. În domeniul de specialitate există un număr de algoritmi diferiți cunoscuți care pot fi utilizați pentru a măsura identitatea secvenței de nucleotide. De exemplu, secvențele de polinucleotide pot fi comparate folosind FASTA, Gap sau Bestfit, care sunt programe din pachetul Wisconsin versiunea 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, care include, de ex., programele FASTA2 și FASTA3, furnizează alinieri și identitatea procentuală a secvenței a regiunilor cu cea mai bună suprapunere între secvențele de interogare și de căutare (a se vedea, de ex., Pearson, Methods Enzymol., 183: 63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol., 132: 185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol., 266: 227-258 (1996); și Pearson, J. Mol. Biol., 276: 71-84 (1998)). Cu excepția cazului în care se specifică în alt fel, sunt utilizați parametrii implicați pentru un anumit program sau algoritm. De exemplu, identitatea procentuală a secvenței între secvențele de acid nucleic poate fi determinată utilizând FASTA cu parametrii săi implicați (o dimensiune a cuvântului de 6 și factorul NOPAM pentru matricea de scor) sau folosind Gap cu parametrii săi implicați, așa cum este prevăzut în GCG versiunea 6.1, încorporată în acest document aici prin referință.

În acest document este descrisă o moleculă de acid nucleic care cuprinde o secvență de nucleotide selectată din grupul care este constituit din SECV ID NRs: 26, 27, 36, 37, 46, 47, 56, 57, 66, 67, 76, 77, 86, 87, 96, 97, 106, 107, 116, 117, 126, 127, 136, 137, 146, 147, 156, 157, 166, 167, 176, 177, 186, 187, 196, 197, 206, 207, 216, 217, 226, și 227. În acest document sunt descrise molecule de acid nucleic care cuprind secvențe de nucleotide care sunt cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% sau 99% identice cu oricare dintre respectivele secvențe de nucleotide.

Într-un aspect, invenția furnizează o moleculă de acid nucleic care cuprinde o secvență de nucleotide selectată din grupul care este constituit din SECV ID NR: 1, 2, 13, și 14.

În oricare dintre variantele de realizare de mai sus, moleculele de acid nucleic pot fi izolate. O moleculă de acid nucleic care codifică lanțul greu și/sau ușor al unui anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia din invenție poate fi izolată din orice sursă care produce un astfel de anticorp sau porțiune. În diferite variante de realizare, moleculele de acid nucleic sunt izolate din celulele B care exprimă un anticorp anti-TIM-3 izolat de la un animal imunizat cu un antigen TIM-3 uman, sau dintr-o celulă imortalizată produsă dintr-o astfel de celulă B. Metodele de izolare a acizilor nucleici care codifică un anticorp sunt binecunoscute în domeniul de specialitate. ARNm poate fi izolat și utilizat pentru a produce ADNc pentru utilizare în reacția în lanț a polimerazei (PCR) sau clonarea ADNc a

genelor de anticorpi. În anumite variante de realizare, o moleculă de acid nucleic din invenție poate fi sintetizată, mai degrabă decât izolată.

În unele variante de realizare, o moleculă de acid nucleic din invenție poate cuprinde o secvență de nucleotide care codifică un domeniu VH dintr-un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen din invenție unită în cadru la o secvență de nucleotide care codifică o regiune constantă a lanțului greu din orice sursă. În mod similar, o moleculă de acid nucleic din invenție poate cuprinde o secvență de nucleotide care codifică un domeniu VL dintr-un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen din invenție unită în cadru la o secvență de nucleotide care codifică o regiune constantă a lanțului ușor din orice sursă.

Într-un aspect suplimentar al invenției, moleculele de acid nucleic care codifică domeniul variabil al lanțurilor grele (VH) și/sau ușoare (VL) pot fi "convertite" în gene de anticorpi de lungime completă. Într-o variantă de realizare, moleculele de acid nucleic care codifică domeniile VH sau VL sunt convertite în gene de anticorpi de lungime completă prin inserarea într-un vector de exprimare care codifică deja domeniul constant al lanțului greu (CH) sau domeniul constant al lanțului ușor (CL), respectiv, astfel încât segmentul VH este legat în mod operativ la segmentul (segmentele) CH din cadrul vectorului și/sau segmentul VL este legat în mod operativ la segmentul CL din cadrul vectorului. Într-o altă variantă de realizare, moleculele de acid nucleic care codifică domeniile VH și/sau VL sunt convertite în gene de anticorpi de lungime completă prin legarea, de ex., ligatura, unei molecule de acid nucleic care codifică un domeniu VH și/sau VL la o moleculă de acid nucleic care codifică un domeniu CH și/sau CL folosind tehnici biologice moleculare standard. Moleculele de acid nucleic care codifică lanțurile grele și/sau ușoare de lungime completă pot fi apoi exprimate dintr-o celulă în care acestea au fost introduse și anticorpul anti-TIM-3 poate fi izolat.

Moleculele de acid nucleic pot fi utilizate pentru a exprima recombinant cantități mari de anticorpi anti-TIM-3. Moleculele de acid nucleic pot fi utilizate, de asemenea, pentru a produce, de ex., anticorpi chimERICI, anticorpi bispecifici, anticorpi cu lanț unic, imunoadezine, diacorpi, anticorpi care au suferit mutație și derivați de anticorpi, așa cum este descris în acest document.

Într-o altă variantă de realizare, o moleculă de acid nucleic din invenție este utilizată ca o sondă sau un primer PCR pentru o secvență specifică de anticorp. De exemplu, acidul nucleic poate fi utilizat ca o sondă în metode de diagnostic sau ca un primer PCR pentru a amplifica regiuni de ADN care ar putea fi utilizate, inter alia, pentru a izola molecule suplimentare de acid nucleic care codifică domenii variabile ale anticorpilor anti-TIM-3. În unele variante de realizare, moleculele de acid nucleic sunt oligonucleotide. În unele variante de realizare, oligonucleotidele provin din domenii înalt variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale anticorpului de interes. În unele variante de realizare, oligonucleotidele codifică toate CDR-urile anticorpilor anti-TIM-3 sau porțiunile de legare la antigen ale acestora din invenție, așa cum este descris în acest document.

Moleculele de acid nucleic și vectorii pot fi utilizați pentru a produce anticorpi anti-TIM-3 care au suferit mutație. Anticorpii pot suferi mutație în domeniile variabile ale lanțurilor grele și/sau ușoare, de ex., pentru a altera o proprietate de legare a anticorpului. Pentru exemplificare, o mutație poate fi făcută în una sau mai multe dintre CDR-uri pentru a crește sau a reduce K_D a anticorpului anti-TIM-3, pentru a crește sau a reduce k_{off} , sau pentru a altera specificitatea de legare a anticorpului. Una sau mai multe mutații pot fi făcute la un reziduu de aminoacid despre care se știe că este schimbat în comparație cu linia germinală într-un anticorp monoclonal din invenție. Mutațiile pot fi făcute într-o CDR sau regiune cadru a unui domeniu variabil, sau într-o regiune constantă. Mutațiile pot fi făcute într-un domeniu variabil. Una sau mai multe mutații pot fi făcute la un reziduu de aminoacid despre care se știe că este schimbat în comparație cu linia germinală într-o CDR sau o regiune cadru a unui domeniu variabil al unui anticorp sau unei porțiuni de legare la antigen a acestuia din invenție.

Regiunea (regiunile) cadru poate (pot) suferi mutații astfel încât regiunea (regiunile) cadru rezultată (rezultate) să aibă secvența de aminoacizi a genei liniei germinale corespunzătoare. O mutație poate fi făcută într-o regiune cadru sau într-o regiune constantă pentru a crește timpul de înjumătățire al anticorpului anti-TIM-3. A se vedea, de ex., publicația PCT WO 00/09560. O mutație într-o regiune cadru sau o regiune constantă poate fi făcută, de asemenea, pentru a altera imunogenicitatea anticorpului, și/sau pentru a furniza un situs pentru legarea covalentă sau necovalentă la o altă moleculă. În acest document este descris un singur anticorp care poate avea mutații în oricare sau mai multe dintre CDR-uri sau regiunile cadru ale domeniului variabil sau în regiunea constantă.

Într-un aspect suplimentar, prezenta invenție furnizează un vector adecvat pentru exprimarea unui sau ambelor lanțuri ale unui anticorp anti-TIM-3 sau ale unei porțiuni de legare la antigen a acestuia, așa cum este definit în revendicări. Termenul "vector", așa cum este utilizat în acest document, înseamnă o moleculă de acid nucleic capabilă să transporte un alt acid nucleic la care a fost legată. În unele variante de realizare, vectorul este o plasmidă, adică o piesă circulară dublu catenară de ADN în care pot fi ligaturate segmente suplimentare de ADN. În unele variante de realizare, vectorul este un vector viral, în care segmente suplimentare de ADN pot fi ligaturate în genomul viral. În unele variante

de realizare, vectorii sunt capabili de replicare autonomă într-o celulă gazdă în care ei sunt introduși (de ex., vectori bacterieni având o origine bacteriană de replicare și vectori epizomali de mamifere). În alte variante de realizare, vectorii (de ex., vectori non-epizomali de mamifere) pot fi integrați în genomul unei celule gazdă la introducerea în celula gazdă și, prin urmare, sunt replicați împreună cu genomul gazdă. Mai mult, anumiți vectori sunt capabili să direcționeze exprimarea genelor la care ei sunt legați operativ. Astfel de vectori sunt denumiți în acest document ca "vectori de exprimare recombinanți" (sau pur și simplu, "vectori de exprimare").

Invenția furnizează vectori care cuprind molecule de acid nucleic care codifică lanțul greu al unui anticorp anti-TIM-3 din invenție sau unei porțiuni de legare la antigen a acestuia, lanțul ușor al unui anticorp anti-TIM-3 din invenție sau unei porțiuni de legare la antigen a acestuia, sau ambele lanțuri grele și ușoare ale unui anticorp anti-TIM-3 din invenție sau unei porțiuni de legare la antigen a acestuia. Invenția furnizează suplimentar vectori care cuprind molecule de acid nucleic care codifică proteine de fuziune, anticorpi modificați, fragmente de anticorpi, și sonde ale acestora.

În unele variante de realizare, anticorpii anti-TIM-3 din invenție sunt exprimați, sau porțiunile de legare la antigen ale acestora sunt exprimate prin inserarea de ADN-uri care codifică lanțuri ușoare și grele de lungime parțială sau completă, obținute așa cum a fost descris mai sus, în vectori de exprimare astfel încât genele sunt legate operativ la secvențele necesare de control al exprimării, cum ar fi secvențele de control transcripțional și translațional. Vectorii de exprimare includ plasmide, retrovirusuri, adenovirusuri, virusuri adeno-asociate (AAV), virusuri vegetale cum ar fi virusul mozaicului de conopidă, virusul mozaicului tutunului, cosmide, YAC-uri, epizomi derivați din EBV, și altele asemenea. Secvența de codificare a anticorpului poate fi ligaturată într-un vector astfel încât secvențele de control transcripțional și translațional din cadrul vectorului servesc funcția lor intenționată de reglare a transcripției și translației pentru secvența de codificare a anticorpului. Vectorul de exprimare și secvențele de control al exprimării pot fi alese pentru a fi compatibile cu celula gazdă de exprimare utilizată. Secvența de codificare a lanțului ușor al anticorpului și secvența de codificare a lanțului greu al anticorpului pot fi inserate în vectori separați și pot fi legate operativ la aceleași secvențe de control al exprimării sau la diferite secvențe de control al exprimării (de ex., promotori). Într-o variantă de realizare, ambele secvențe de codificare sunt inserate în același vector de exprimare, și pot fi legate operativ la aceleași secvențe de control al exprimării (de ex., un promotor comun), pentru a separa secvențe identice de control al exprimării (de ex., promotori) sau la diferite secvențe de control al exprimării (de ex., promotori). Secvențele de codificare ale anticorpului pot fi inserate în vectorul de exprimare prin metode standard (de ex., ligatura situsurilor de restricție complementare pe fragmentul genei de anticorp și vector, sau ligatura capătului țesit dacă nu sunt prezente situsuri de restricție).

Un vector convenabil este unul care codifică o secvență de imunoglobulină CH sau CL umană completă din punct de vedere funcțional, cu situsuri de restricție corespunzătoare proiectate prin inginerie astfel încât orice secvență VH sau VL poate fi inserată și exprimată cu ușurință, așa cum este descris mai sus. Genele de codificare HC și LC în astfel de vectori pot conține secvențe de intron care vor avea ca rezultat randamente de proteine de anticorpi îmbunătățite global prin stabilizarea ARNm înrudit. Secvențele de intron sunt flancate de situsuri donor de îmbinare și acceptor de îmbinare, care determină unde va avea loc îmbinarea ARN. Locația secvențelor de introni poate fi fie în regiuni variabile sau constante ale lanțurilor de anticorpi, fie atât în regiunile variabile cât și constante atunci când sunt utilizați mai mulți introni. Poliadenilarea și terminarea transcripției pot avea loc la situsurile cromozomiale native în aval de regiunile de codificare. Vectorul de exprimare recombinant poate codifica, de asemenea, o peptidă semnal care facilitează secreția lanțului de anticorp dintr-o celulă gazdă. Gena lanțului de anticorp poate fi clonată în vector astfel încât peptida semnal este legată în cadru la capătul amino terminal al lanțului de imunoglobulină. Peptida semnal poate fi o peptidă semnal de imunoglobulină sau o peptidă semnal heterologă (adică, o peptidă semnal dintr-o proteină non-imunoglobulină).

În plus față de genele lanțului de anticorp, vectorii de exprimare recombinanți din invenție poartă secvențe de reglare care controlează exprimarea genelor lanțului de anticorp într-o celulă gazdă. Se va aprecia, de cei care au pregătire în domeniul de specialitate, că proiectarea vectorului de exprimare, inclusiv selecția secvențelor de reglare, poate depinde de factori precum alegerea celulei gazdă care urmează să fie transformată, nivelul de exprimare al proteinei dorite, etc. Secvențele de reglare preferate pentru exprimarea celulei gazdă de mamifer includ elemente virale care direcționează niveluri ridicate de exprimare a proteinei în celulele de mamifere, cum ar fi promotorii și/sau amplificatorii derivați din LTR-uri retrovirale, citomegalovirus (CMV) (cum ar fi promotorul/amplificatorul CMV), Virusul Simian 40 (SV40) (cum ar fi promotorul/amplificatorul SV40), adenovirus (de ex., promotorul tardiv principal al adenovirusului (AdMLP)), poliomi și promotori puternici de mamifere cum ar fi promotorii nativi de imunoglobulină și actină. Pentru descrierea suplimentară a elementelor de reglare virală, și a secvențelor acestora, a se vedea, de ex., brevetele de invenție U.S. 5.168.062, 4.510.245 și 4.968.615. Metodele pentru exprimarea anticorpilor în plante, inclusiv o descriere a promotorilor și vectorilor, precum și transformarea plantelor, sunt cunoscute în domeniul de specialitate. A se vedea, de ex., brevetul de

invenție U.S. 6.517.529. Metodele pentru exprimarea polipeptidelor în celule bacteriene sau celule fungice, de ex., celule de drojdie, sunt, de asemenea, binecunoscute în domeniul de specialitate

În plus față de genele lanțului de anticorp și secvențele de reglare, vectorii de exprimare recombinanți din invenție pot purta secvențe suplimentare, cum ar fi secvențele care reglează replicarea vectorului în celulele gazdă (de ex., originile replicării) și genele marker selectabile. Gena marker selectabilă facilitează selecția celulelor gazdă în care a fost introdus vectorul (a se vedea, de ex., brevetele de invenție U.S. 4.399.216, 4.634.665 și 5.179.017). Pentru exemplificare, în mod tipic, gena marker selectabilă conferă rezistență la medicamente, cum ar fi G418, higromicină sau metotrexat, unei celule gazdă în care a fost introdus vectorul. Pentru exemplificare, genele marker selectabile includ gena de dihidrofolat reductază (DHFR) (pentru utilizare în celulele gazdă dhfr cu selecție/amplificare cu metotrexat), gena neo (pentru selecția G418) și gena glutamat sintetază.

Termenul "secvență de control al exprimării", așa cum este utilizat în acest document, înseamnă secvențe de polinucleotide care sunt necesare pentru a efectua exprimarea și procesarea secvențelor de codificare la care acestea sunt legate. Secvențele de control al exprimării includ secvențe adecvate de inițiere a transcripției, de terminare, promotor și amplificator; semnale eficiente de procesare a ARN, cum ar fi semnalele de îmbinare și poliadenilare; secvențe care stabilizează ARNm citoplasmatic; secvențe care îmbunătățesc eficiența de translație (adică, secvența consens Kozak); secvențe care îmbunătățesc stabilitatea proteinelor; și, atunci când se dorește, secvențe care îmbunătățesc secreția de proteine. Natura unor astfel de secvențe de control diferă în funcție de organismul gazdă; la procariote, astfel de secvențe de control includ în general promotorul, situsul de legare ribozomal și secvența de terminare a transcripției; la eucariote, în general, astfel de secvențe de control includ promotori și secvența de terminare a transcripției. Termenul "secvențe de control" este destinat să includă, cel puțin, toate componentele a căror prezență este esențială pentru exprimare și procesare, și poate include, de asemenea, componente suplimentare a căror prezență este avantajoasă, pentru exemplificare, secvențe lider și secvențe partener de fuziune.

Celule gazdă și metode pentru producerea anticorpului și compoziției de anticorp

Un aspect suplimentar al invenției se referă la metode pentru producerea compozițiilor de anticorpi și a anticorpilor și a porțiunilor de legare la antigen ale acestora din invenție. O variantă de realizare a acestui aspect al invenției se referă la o metodă pentru producerea unui anticorp așa cum este definit în revendicări, care cuprinde furnizarea unei celule gazdă recombinante capabile să exprime anticorpul, cultivarea respectivei celule gazdă în condiții adecvate pentru exprimarea anticorpului, și izolarea anticorpului rezultat. Anticorpul produs printr-o astfel de exprimare în astfel de celule gazdă recombinante sunt menționați în acest document ca "anticorpi recombinanți". Invenția furnizează, de asemenea, celule descendente ale unor astfel de celule gazdă, și anticorpi produși de acestea.

Termenul "celulă gazdă recombinantă" (sau pur și simplu "celulă gazdă"), așa cum este utilizat în acest document, înseamnă o celulă în care a fost introdus un vector de exprimare recombinant. Invenția furnizează celule gazdă care cuprind un vector conform invenției descris mai sus. Invenția furnizează, de asemenea, celule gazdă care cuprind o secvență de nucleotide care codifică lanțul greu sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, și o secvență de nucleotide care codifică lanțul ușor sau o porțiune de legare la antigen a acestuia ale unui anticorp anti-TIM-3 sau porțiune de legare la antigen a acestuia din invenție. Ar trebui să se înțeleagă că "celulă gazdă recombinantă" și "celulă gazdă" înseamnă nu numai celula subiect particulară, ci, de asemenea, descendența unei astfel de celule. Deoarece anumite modificări pot apărea în generațiile următoare, datorită fie mutației, fie influențelor mediului, astfel de descendenți pot să nu fie, de fapt, identici cu celula părinte, dar sunt încă incluși în domeniul de aplicare al termenului "celulă gazdă" așa cum este utilizat în acest document.

Moleculele de acid nucleic care codifică anticorpi anti-TIM-3 și vectorii care cuprind aceste molecule de acid nucleic se pot utiliza pentru transfecția unei celule gazdă adecvate de mamifer, plantă, bacterie sau drojdie. Transformarea poate fi prin orice metodă cunoscută pentru introducerea polinucleotidelor într-o celulă gazdă. Metodele pentru introducerea polinucleotidelor heterologe în celulele de mamifere sunt bine cunoscute în domeniul de specialitate și includ transfecția mediată de dextran, precipitarea cu fosfat de calciu, transfecția mediată de polibrenă, fuziunea protoplaștilor, electroporarea, încapsularea polinucleotidei (polinucleotidelor) în lipozomi, și microinjecția directă a ADN în nucleu. În plus, moleculele de acid nucleic pot fi introduse în celulele de mamifere prin vectori virali. Metodele pentru transformarea celulelor sunt bine cunoscute în domeniul de specialitate. A se vedea, de ex., brevetele de invenție U.S. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, și 4.959.455. Metodele pentru transformarea celulelor de plante sunt bine cunoscute în domeniul de specialitate, incluzând, de ex., transformarea mediată de Agrobacterium, transformarea biolistică, injectarea directă, electroporarea și transformarea virală. Metodele pentru transformarea celulelor bacteriene și de drojdie sunt, de asemenea, bine cunoscute în domeniul de specialitate.

Linii de celule de mamifere disponibile ca gazde pentru exprimare sunt bine cunoscute în domeniul de specialitate, și includ multe linii celulare imortalizate disponibile de la American Type

Culture Collection (ATCC). Acestea includ, *inter alia*, celulele de ovar de hamster chinezesc (CHO), celulele NS0, celulele SP2, celulele HEK-293T, celulele 293 Freestyle (Invitrogen), celulele NIH-3T3, celulele HeLa, celulele de rinichi de pui de hamster (BHK), celulele de rinichi de maimuță verde africană (COS), celulele de carcinom hepatocelular uman (de ex., Hep G2), celulele A549, și un număr de alte linii celulare. Liniile celulare de preferință particulară sunt selectate determinând care linii celulare au niveluri de exprimare ridicate. Alte linii celulare care pot fi utilizate sunt liniile celulare de insecte, cum ar fi celulele Sf9 sau Sf21. Atunci când în celulele gazdă de mamifere sunt introduși vectori de exprimare recombinanți care codifică gene de anticorpi, anticorpii sunt produși prin cultivarea celulelor gazdă pentru o perioadă de timp suficientă pentru a permite exprimarea anticorpului în celulele gazdă sau, mai preferabil, secreția anticorpului în mediul de cultură în care sunt crescute celulele gazdă. Anticorpii pot fi recuperați din mediul de cultură folosind metode standard de purificare a proteinelor. Celulele gazdă de plante includ, de ex., *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lentile de apă, porumb, grâu, cartofi, etc. Celulele gazdă bacteriene includ speciile *E. coli* și *Streptomyces*. Celulele gazdă de drojdie includ *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* și *Pichia pastoris*.

Suplimentar, exprimarea anticorpilor din invenție sau a porțiunilor de legare la antigen ale acestora din linii celulare de producție poate fi îmbunătățită utilizând un număr de tehnici cunoscute. Pentru exemplificare, sistemul de exprimare a genei de glutamin sintetază (sistemul GS) este o abordare uzuală pentru îmbunătățirea exprimării în anumite condiții. Sistemul GS este discutat în întregime sau parțial în legătură cu brevetele EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 și 0 338 841.

Este probabil ca anticorpii exprimați de linii celulare diferite sau în animalele transgenice să aibă șabloane de glicozilare diferite unul față de celălalt. Totuși, toți anticorpii codificați de moleculele de acid nucleic furnizate în acest document, sau care cuprind secvențele de aminoacizi furnizate în acest document fac parte din prezenta invenție, indiferent de starea de glicozilare a anticorpilor, și, mai în general, indiferent de prezența sau absența modificării (modificărilor) post-tranlaționale.

Compoziții farmaceutice

Un alt aspect al invenției este o compoziție farmaceutică ce cuprinde ca un ingredient activ (sau ca unicul ingredient activ) un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, o moleculă de legare bi-specifică, sau o compoziție de anticorp anti-TIM-3 din invenție. Compoziția farmaceutică poate cuprinde orice compoziție de anticorp anti-TIM-3, moleculă de legare bi-specifică, sau anticorp sau porțiune de legare la antigen a acestuia, așa cum este definit în revendicări. În unele variante de realizare, compozițiile sunt destinate ameliorării, prevenirii, și/sau tratamentului unei tulburări legate de TIM-3 (de ex., o tulburare caracterizată prin supraexprimarea sau hiperactivitatea TIM-3 sau a oricăruia dintre liganzii săi) și/sau cancer. În unele variante de realizare, compozițiile sunt destinate activării sistemului imunitar. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt destinate ameliorării, prevenirii, și/sau tratamentului cancerului care își are originea în țesuturi precum piele, plămân, intestin, ovar, creier, prostată, rinichi, țesuturi moi, sistemul hematopoietic, cap și gât, ficat, vezică urinară, sân, stomac, uter și pancreas.

În general, anticorpii din invenție sau porțiunile de legare la antigen ale acestora sau moleculele de legare bi-specifice din invenție sunt adecvate pentru a fi administrate ca o formulare în asociere cu unul sau mai mulți excipienți acceptabili din punct de vedere farmaceutic, de ex., așa cum este descris mai jos.

Compozițiile farmaceutice din invenție vor cuprinde unul sau mai mulți anticorpi anti-TIM-3 sau porțiuni de legare, sau molecule de legare bi-specifice, din invenție, de ex., unul sau doi anticorpi anti-TIM-3 sau porțiuni de legare sau molecule de legare bi-specifice. Într-o variantă de realizare, compoziția cuprinde un singur anticorp anti-TIM-3 din invenție sau o porțiune de legare a acestuia.

Compoziția farmaceutică cuprinde cel puțin un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, de ex., un anticorp anti-TIM-3 sau porțiune, sau o moleculă de legare bi-specifică, și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care țintesc unul sau receptori de suprafață celulară mai relevanți, de ex., unul sau mai mulți receptori relevanți de cancer.

Termenul "excipient" este utilizat în acest document pentru a descrie orice ingredient altul decât compusul(i) din invenție. Alegerea excipientului(lor) va depinde în mare măsură de factori cum ar fi modul particular de administrare, efectul excipientului asupra solubilității și stabilității, și natura formei de dozare. Așa cum este utilizat în acest document, "excipient acceptabil din punct de vedere farmaceutic" include oricare și toți solvenții, mediile de dispersie, acoperirile, agenții antibacterieni și antifungici, agenții izotonici și de întârziere a absorbției, și alții asemenea care sunt compatibili din punct de vedere fiziologic. Câteva exemple de excipienți acceptabili din punct de vedere farmaceutic sunt apa, soluția salină, soluție salină tamponată cu fosfat, dextroza, glicerolul, etanolul și altele asemenea, precum și combinațiile acestora. În multe cazuri, va fi preferabil să se includă în compoziție agenți izotonici, pentru exemplificare, zaharuri, polialcoolii cum ar fi manitolul, sorbitolul, sau clorura de sodiu în compoziție. Exemple suplimentare de substanțe acceptabile din punct de vedere farmaceutic sunt

agenții de umectare sau cantitățile minore de substanțe auxiliare cum ar fi agenții de umectare sau emulsionare, conservanții sau tampoanele, care sporesc durata de valabilitate sau eficacitatea anticorpului.

Compozițiile farmaceutice din prezenta invenție și metodele pentru prepararea lor vor fi evidente cu ușurință pentru cei care au pregătire în domeniul de specialitate. Astfel de compoziții și metode pentru prepararea lor pot fi găsite, de exemplu, în Remington's Pharmaceutical Sciences, ediția a 19-a (Mack Publishing Company, 1995). Compozițiile farmaceutice sunt fabricate, de preferință, în condiții GMP (bune practici de fabricație).

O compoziție farmaceutică din invenție poate fi preparată, ambalată, sau vândută în vrac, ca o doză unitară singură, sau ca o multitudine de doze unitare singure. Așa cum este utilizată în acest document, o "doză unitară" este o cantitate discretă din compoziția farmaceutică ce cuprinde o cantitate predeterminată din ingredientul activ. Cantitatea din ingredientul activ este egală, în general, cu doza de ingredient activ care ar fi administrată unui subiect sau o fracțiune convenabilă dintr-o astfel de doză, cum ar fi, pentru exemplificare, o jumătate sau o treime dintr-o astfel de doză.

Orice metodă pentru administrarea peptidelor, proteinelor sau anticorpilor acceptată în domeniul de specialitate poate fi utilizată în mod adecvat pentru anticorpii și porțiunile de legare la antigen din invenție.

Compozițiile farmaceutice din invenție sunt adecvate, de obicei, pentru administrare parenterală. Așa cum se utilizează în acest document, "administrarea parenterală" a unei compoziții farmaceutice include orice cale de administrare caracterizată prin distrugerea fizică a unui țesut al unui subiect și administrarea compoziției farmaceutice prin breșă în țesut, rezultând astfel, în general, administrarea directă în fluxul sanguin, în mușchi, sau într-un organ intern. Administrarea parenterală include, prin urmare, dar nu este limitată la, administrarea unei compoziții farmaceutice prin injectarea compoziției, prin aplicarea compoziției printr-o incizie chirurgicală, prin aplicarea compoziției printr-o rană non-chirurgicală care penetrează țesutul, și altele asemenea. În particular, administrarea parenterală este avută în vedere să includă, dar nu este limitată la, injecție sau perfuzie subcutanată, intraperitoneală, intramusculară, intrasternală, intravenoasă, intra-arterială, intratecală, intraventriculară, intrauretrală, intracraniană, și intrasinovială; și tehnici de perfuzie dialitică renală. Este avută în vedere, de asemenea, perfuzia regională. Variantele de realizare particulare includ căile intravenoase și subcutanate.

Formulările unei compoziții farmaceutice adecvate pentru administrare parenterală cuprind, de obicei, ingredientul activ combinat cu un transportor acceptabil din punct de vedere farmaceutic, cum ar fi apă sterilă sau soluția salină izotonică sterilă. Astfel de formulări pot fi preparate, ambalate, sau vândute într-o formă adecvată pentru administrare în bolus sau pentru administrare continuă. Formulările injectabile pot fi preparate, ambalate, sau vândute în formă de dozare unitară, cum ar fi în fiole sau în recipiente cu doze multiple care conțin un conservant. Formulările pentru administrare parenterală includ, dar nu sunt limitate la, suspensii, soluții, emulsii în vehicule uleioase sau apoase, paste, și altele asemenea. Astfel de formulări pot cuprinde suplimentar unul sau mai multe ingrediente suplimentare incluzând, dar fără a se limita la, agenți de suspendare, stabilizare, sau dispersare. Într-o variantă de realizare a unei formulări pentru administrare parenterală, ingredientul activ este furnizat sub formă uscată (adică, pulbere sau granulară) pentru reconstituire cu un vehicul adecvat (de ex., apă sterilă apirogenă) înainte de administrarea parenterală a compoziției reconstituite. Formulările parenterale includ, de asemenea, soluții apoase care pot conține excipienți precum săruri, carbohidrați și agenți de tamponare (de preferință la un pH de la 3 până la 9), dar, pentru unele aplicații, acestea pot fi formulate în mod mai adecvat ca o soluție non-apoasă sterilă sau ca o formă uscată pentru a fi utilizată împreună cu un vehicul adecvat, cum ar fi apa sterilă, apirogenă. Formele de administrare parenterală cu titlu de exemplu includ soluții sau suspensii în soluții apoase sterile, pentru exemplificare, soluții apoase de propilen glicol sau dextroză. Astfel de forme de dozare pot fi tamponate în mod adecvat, dacă se dorește. Alte formulări care pot fi administrate parental care sunt utile le includ pe cele care cuprind ingredientul activ sub formă microcristalină, sau într-un preparat lipozomal. Formulările pentru administrare parenterală pot fi formulate pentru a fi cu eliberare imediată și/sau modificată. Formulările cu eliberare modificată includ eliberarea întârziată, susținută, pulsată, controlată, țintită și programată.

Pentru exemplificare, într-un aspect, soluțiile injectabile sterile pot fi preparate prin încorporarea anticorpului anti-TIM-3 sau a porțiunii de legare la antigen a acestuia, a moleculei de legare bi-specifice, sau a compoziției de anticorpi anti-TIM-3 în cantitatea necesară într-un solvent corespunzător cu un ingredient sau o combinație de ingrediente enumerate mai sus, după cum este necesar, urmată de sterilizare prin filtrare. În general, dispersiile sunt preparate prin încorporarea compusului activ într-un vehicul steril care conține un mediu de dispersie bazic și celelalte ingrediente necesare dintre cele enumerate mai sus. În cazul pulberilor sterile pentru prepararea soluțiilor injectabile sterile, metodele preferate de preparare sunt uscarea în vid și uscarea prin congelare care produce o pulbere a ingredientului activ plus orice ingredient suplimentar dorit dintr-o soluție filtrată steril în prealabil a acestuia. Fluiditatea corectă a unei soluții poate fi menținută, pentru exemplificare, prin utilizarea unei acoperiri cum ar fi lecitina, prin menținerea dimensiunii necesare a particulelor în cazul dispersiei și prin

utilizarea de agenți activi de suprafață. Absorbția prelungită a compozițiilor injectabile poate fi realizată prin includerea în compoziție a unui agent care întârzie absorbția, pentru exemplificare, săruri de monostearat de gelatină, și/sau prin utilizarea de acoperiri cu eliberare modificată (de ex., acoperiri cu eliberare lentă).

Anticorpul din invenție pot fi administrați, de asemenea, intranasal sau prin inhalare, de obicei sub formă de pulbere uscată (fie singuri, fie sub formă de amestec, fie ca o particulă componentă mixtă, pentru exemplificare, amestecată cu un excipient adecvat acceptabil din punct de vedere farmaceutic) dintr-un inhalator de pulbere uscată, ca un spray de aerosoli dintr-un recipient presurizat, o pompă, un spray, atomizor (preferabil un atomizor care utilizează electrohidrodinamică pentru a produce o ceață fină), sau nebulizator, cu sau fără utilizarea unui propulsor adecvat, sau ca picături nazale.

Recipientul sub presiune, pompa, spray-ul, atomizorul, sau nebulizatorul conține în general o soluție sau suspensie a unui anticorp din invenție care cuprinde, pentru exemplificare, un agent adecvat pentru dispersarea, solubilizarea, sau extinderea eliberării substanței active, un propulsor(i) ca solvent.

Înainte de utilizare într-o formulare de pulbere uscată sau suspensie, produsul medicamentos este în general micronizat la o dimensiune adecvată pentru administrare prin inhalare (de obicei mai mică de 5 microni). Acest lucru poate fi obținut prin orice metodă de mărunțire corespunzătoare, cum ar fi măcinarea cu jet spiralat, măcinarea cu jet în pat fluidizat, procesarea fluidului supercritic pentru a forma nanoparticule, omogenizarea la presiune înaltă, sau uscarea prin pulverizare.

Capsulele, blisterele și cartușele pentru utilizare într-un inhalator sau insuflator pot fi formulate pentru a conține un amestec de pulbere al compusului din invenție, o bază de pulbere adecvată și un modulator de performanță.

O formulare de soluție adecvată pentru utilizare într-un atomizator care utilizează electrohidrodinamică pentru a produce o ceață fină poate conține o doză adecvată din anticorpul din invenție per acționare și volumul de acționare poate varia, pentru exemplificare, de la 1 μ L până la 100 μ L.

La acele formulări din invenție destinate administrării prin inhalare/intranazale pot fi adăugate arome adecvate, cum ar fi mentolul și levomentolul, sau îndulcitori, cum ar fi zaharina sau zaharina sodică.

Formulările pentru administrare prin inhalare/intranazală pot fi formulate pentru a fi cu eliberare imediată și/sau modificată. Formulările cu eliberare modificată includ eliberarea întârziată, susținută, pulsată, controlată, țintită și programată.

În cazul inhalatoarelor și aerosolilor cu pulbere uscată, unitatea de dozare este determinată cu ajutorul unei supape care furnizează o cantitate măsurată. Unitățile în conformitate cu invenția sunt configurate în mod obișnuit pentru a administra o doză măsurată sau "puf" dintr-un anticorp din invenție. Doza zilnică totală va fi administrată, de obicei, într-o singură doză sau, mai uzual, ca doze divizate de-a lungul unei zile întregi.

Anticorpul și porțiunile de anticorp din invenție se pot formula, de asemenea, pentru o administrare pe cale orală. Administrarea orală poate implica înghițire, astfel încât compusul să intre în tractul gastrointestinal, și/sau administrare bucală, linguală, sau sublinguală prin care compusul intră în fluxul sanguin direct din gură.

Formulările adecvate pentru administrare orală includ sisteme solide, semi-solide și lichide, cum ar fi tabletele; capsule moi sau tari care conțin multi- sau nano-particule, lichide, sau pulberi; pastile (inclusiv umplute cu lichid); gume; geluri; forme de dozare cu dispersare rapidă; filme; ovule; spray-uri; și plăsturi bucale/mucoadezivi.

Formulările lichide includ suspensii, soluții, siropuri și elixiruri. Asemenea formulări pot fi folosite ca umpluturi în capsule moi sau tari (facute, pentru exemplificare, din gelatină sau hidroxipropilmetilceluloză) și cuprind în mod obișnuit un transportor, pentru exemplificare, apă, etanol, polietilen glicol, propilen glicol, metilceluloză, sau un ulei adecvat, și unul sau mai mulți agenți de emulsionare și/sau agenți de suspendare. Formulările lichide pot fi preparate, de asemenea, prin reconstituirea unui solid, pentru exemplificare, dintr-un plic.

Utilizări terapeutice ale anticorpilor și compozițiilor din invenție

Într-un aspect, anticorpul anti-TIM-3 și porțiunile de legare la antigen ale acestora, compozițiile anti-TIM-3, și moleculele de legare bi-specifice din invenție sunt pentru utilizare în îmbunătățirea sau activarea sistemului imunitar la un om care are nevoie de acest lucru. În unele variante de realizare, pacientul are o afecțiune caracterizată prin supraexprimarea sau hiperactivitatea TIM-3 sau a oricăruia dintre liganzii săi. În unele variante de realizare, pacientul este imuno-deprimat. În anumite variante de realizare, anticorpul sau porțiunea de legare a antigenului a acestuia, compoziția, sau molecula de legare bi-specifică este pentru utilizare în tratamentul cancerului, de ex., cancer care provine din țesuturi cum ar fi pielea, plămânul, intestinul, ovarul, creierul, prostata, rinichiul, țesuturile moi, sistemul hematopoietic, capul și gâtul, ficatul, vezica urinară, sânul, stomacul, uterul și pancreasul, și orice cancer sau alte afecțiuni care se bazează pe activitatea TIM-3 și/sau în care pacientul exprimă sau supraexprimă

galectina-9, fosfatidilserina, CEACAM-1 și/sau HMGB-1. Cancerelor tratate cu anticorpii anti-TIM-3, porțiunile de legare la antigen ale acestora, compozițiile de anticorpi anti-TIM-3, și/sau moleculele de legare bi-specifice din invenție pot include, de ex., melanomul, cancerul pulmonar fără celule mici, cancerul colorectal, carcinomul cu celule renale, leucemia (de ex., leucemie mieloidă acută), și tumorile solide (de ex., tumori solide avansate sau metastatice).

În unele variante de realizare, cancerelor tratate de anticorpii anti-TIM-3, porțiunile de legare la antigen, compozițiile anti-TIM-3, și/sau moleculele de legare bi-specifice din invenție pot include, de ex., melanomul (de ex., melanomul avansat sau metastatic), cancerul pulmonar fără celule mici, cancerul cu celule scuamoase de cap și gât, carcinomul cu celule renale, limfomul Hodgkin, limfomul non-Hodgkin, glioblastomul, gliomul, cancerul pulmonar cu celule scuamoase, cancerul pulmonar cu celule mici, carcinomul hepatocelular, cancerul de vezică urinară, cancerul de tract urinar superior, cancerul esofagian, cancerul de joncțiune gastroesofagiană, cancerul gastric, cancerul hepatic, cancerul de colon, carcinomul colorectal, mielomul multiplu, sarcoamele, leucemia mieloidă acută, leucemia mieloidă cronică, sindromul mielodisplazic, cancerul nazofaringian, leucemia limfocitară cronică, leucemia limfoblastică acută, limfomul limfocitar mic, cancerul ovarian, cancerul gastrointestinal, cancerul peritoneal primar, cancerul de trompe uterine, cancerul urotelial, leucemia/limfomul cu celule T asociat cu HTLV, cancerul de prostată, cancerul genito-urinar, meningiomul, cancerul corticosuprarenal, gliosarcomul, fibrosarcomul, cancerul de rinichi, cancerul de sân, cancerul pancreatic, cancerul endometrial, cancerul de piele cu celule bazale, cancerul de apendice, cancerul de tract biliar, cancerul de glande salivare, cancerul avansat cu celule Merkel, limfomul cu celule B mari difuz, limfomul folicular, mezoteliomul, și tumorile solide.

Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia, compoziția, sau molecula de legare bi-specifică poate fi pentru utilizare în tratarea infecțiilor virale și/sau parazitare, de ex., în cazul în care agenții patogeni inhibă răspunsul imun al gazdei.

"A trata", "tratare" și "tratament" se referă la o metodă de atenuare sau abrogare a unei tulburări biologice și/sau a cel puțin unul dintre simptomele asociate acesteia. Așa cum se utilizează în acest document, a "atenua" o boală, tulburare sau afecțiune înseamnă reducerea severității și/sau frecvenței de apariție a simptomelor bolii, tulburării, sau afecțiunii. Mai mult decât atât, referințele din acest document la "tratament" includ referiri la tratament curativ, paliativ și profilactic.

"Cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic" se referă la cantitatea din agentul terapeutic administrat care va ameliora într-o oarecare măsură unul sau mai multe dintre simptomele tulburării care este tratată. O cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic dintr-un terapeutic anti-cancer, pentru exemplificare, poate avea ca rezultat micșorarea tumorii, supraviețuire crescută, eliminarea celulelor canceroase, progresie a bolii scăzută, inversarea metastazelor, sau alte obiective clinice dorite de profesioniștii din domeniul sănătății.

Compozițiile de anticorpi sau anticorpii sau porțiunile de legare la antigen ale acestora din invenție pot fi administrate singure sau în combinație cu unul sau mai multe alte medicamente sau anticorpi (sau ca orice combinație a acestora). Compozițiile farmaceutice, metodele și utilizările din invenție cuprind, prin urmare, de asemenea, variante de realizare ale combinațiilor (co-administrare) cu alți agenți activi, așa cum este detaliat mai jos.

Așa cum sunt utilizați în acest document, termenii "co-administrare", "co-administrat" și "în combinație cu", cu referire la compozițiile de anticorpi, anticorpii și porțiunile de legare la antigen ale acestora, și moleculele de legare bi-specifice din invenție cu unul sau mai mulți alți agenți terapeutici, se intenționează să însemne, și se referă la, și includ următoarele:

- administrarea simultană a unei astfel de combinații de compoziție de anticorpi/anticorp/porțiune de legare la antigen/moleculă de legare bi-specifică din invenție și agent terapeutic (agenți terapeutici) către un pacient care are nevoie de tratament, atunci când astfel de componente sunt formulate împreună într-o singură formă de dozare care eliberează respectivele componente în mod substanțial în același timp către respectivul pacient,

- administrarea în mod substanțial simultană a unei astfel de combinații de compoziție de anticorpi/anticorp/porțiune de legare la antigen/moleculă de legare bi-specifică din invenție și agent terapeutic (agenți terapeutici) către un pacient care are nevoie de tratament, atunci când astfel de componente sunt formulate separat unele de celelalte în forme de dozare separate care sunt luate în mod substanțial în același timp de către respectivul pacient, după care respectivele componente sunt eliberate în mod substanțial în același timp către respectivul pacient,

- administrarea secvențială a unei astfel de combinații de compoziție de anticorpi/anticorp/porțiune de legare la antigen/moleculă de legare bi-specifică din invenție și agent terapeutic (agenți terapeutici) către un pacient care are nevoie de tratament, atunci când astfel de componente sunt formulate separat unele de celelalte în forme de dozare separate care sunt luate la momente consecutive de către respectivul pacient cu un interval de timp semnificativ între fiecare

administrare, după care respectivele componente sunt eliberate la momente în mod substanțial diferite către respectivul pacient; și

- administrarea secvențială a unei astfel de combinații de compoziție de anticorpi/anticorp/porțiune de legare la antigen/moleculă de legare bi-specifică din invenție și agent terapeutic (agenți terapeutici) către un pacient care are nevoie de tratament, atunci când astfel de componente sunt formulate împreună într-o singură formă de dozare care eliberează respectivele componente într-o manieră controlată, după care acestea sunt eliberate concomitent, consecutiv, și/sau suprapus în același timp și/sau momente diferite către respectivul pacient, unde fiecare parte poate fi administrată fie pe aceeași cale, fie pe o cale diferită.

Compozițiile de anticorpi, anticorpilor și porțiunile de legare la antigen ale acestora, și moleculele de legare bi-specifice din invenție, pot fi administrate fără tratamente terapeutice suplimentare, adică drept terapie de sine stătătoare. Alternativ, tratamentul cu compozițiile de anticorpi și anticorpilor și porțiunile de legare la antigen ale acestora din invenție poate include cel puțin un tratament terapeutic suplimentar (terapie combinată). În unele variante de realizare, compoziția de anticorp sau anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia se poate co-administra sau formula cu o altă medicație/un alt medicament pentru tratamentul cancerului. Tratamentul terapeutic suplimentar poate cuprinde, de ex., un agent chimioterapeutic, anti-neoplazic, sau anti-angiogenic, un anticorp anti-cancer diferit, și/sau terapie radio.

Prin combinarea compozițiilor de anticorpi, anticorpilor sau porțiunilor de legare la antigen, sau moleculelor de legare bi-specifice din invenție cu agenți cunoscuți că induc diferențierea terminală a celulelor canceroase, efectul poate fi îmbunătățit în continuare. Astfel de compuși pot fi selectați, pentru exemplificare, din grupul care este constituit din acid retinoic, acizi trans-retinoici, acizi cis-retinoici, fenilbutirat, factor de creștere a nervilor, dimetil sulfoxid, forma activă a vitaminei D3, receptorul gamma activat de proliferator de peroxizomi, 13-acetat de 12-O-tetradecanoilforbol, hexametil-bis-acetamidă, factorul beta de creștere transformant, acid butiric, AMP ciclic, și vesnarinonă. În unele variante de realizare, compusul este selectat din grupul care este constituit din acid retinoic, fenilbutirat, acid all-trans-retinoic și forma activă a vitaminei D.

Articolele farmaceutice care cuprind o compoziție de un anticorp anti-TIM-3, anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, sau moleculă de legare bi-specifică din invenție și cel puțin un alt agent (de ex., un agent chimioterapeutic, anti-neoplazic, sau anti-angiogenic) pot fi utilizate ca un tratament combinat pentru administrare simultană, separată sau succesivă în terapia cancerului. Celălalt agent poate fi orice agent adecvat pentru tratamentul cancerului particular în cauză, pentru exemplificare, un agent selectat din grupul care este constituit din agenți de alchilare, de ex., derivați de platină precum cisplatină, carboplatină și/sau oxaliplatină; alcoizi vegetali, de ex., paclitaxel, docetaxel și/sau irinotecan; antibiotice antitumorale, de ex., doxorubicină (adriamicină), daunorubicină, epirubicină, idarubicină mitoxantronă, dactinomycină, bleomicină, actinomycină, luteomicină, și/sau mitomicină; inhibitori ai topoizomerazei precum topotecan; și/sau antimetaboliți, de ex., fluoruracil și/sau alte fluorpirimidine.

Un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, o moleculă de legare bi-specifică, sau o compoziție de anticorp anti-TIM-3 din invenție poate fi utilizată, de asemenea, în combinație cu alte terapii anti-cancer, cum ar fi vaccinuri, citokine, inhibitori de enzime și terapii cu celule T. În cazul unui vaccin, acesta poate fi, de ex., un vaccin proteic, peptidic sau ADN care conține unul sau mai mulți antigeni care sunt relevanți pentru cancerul care este tratat, sau un vaccin care cuprinde celule dendritice împreună cu un antigen. Citokinele adecvate includ, pentru exemplificare, IL-2, IFN-gamma și GM-CSF. Un exemplu de un tip de inhibitor enzimatic care are activitate anti-cancer este un inhibitor de indoleamin-2,3-dioxigenază (IDO), pentru exemplificare 1-metil-D-triptofan (1-D-MT). Terapia adoptivă cu celule T se referă la diferite tehnici de imunoterapie care implică extinderea sau proiectarea prin inginerie a celulelor T proprii ale pacienților pentru a recunoaște și ataca tumorile lor.

Se are în vedere, de asemenea, că un anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, o moleculă de legare bi-specifică, sau o compoziție de anticorp anti-TIM-3 din invenție poate fi utilizată în terapia adjuvantă în conexiune cu inhibitorii tirozin kinazei. Aceștia sunt molecule sintetice, în principal derivate din chinazolină, cu greutate moleculară mică, ce interacționează cu domeniul intracelular al tirozin kinazei al receptorilor și inhibă fosforilarea receptorului indusă de ligand prin concurența pentru situsul de legare de Mg-ATP intracelular.

În unele variante de realizare, compoziția de anticorp, molecula de legare bi-specifică, sau anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia se poate utiliza în combinație cu un altă medicație/medicament care mediază activarea sistemului imunitar, incluzând, dar fără a se limita la, un agent care mediază exprimarea sau activitatea A2AR, BLTA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD39, CD40, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (de ex., CEACAM-1 și/sau CEACAM-5), galectina-9, GITR, HVEM, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, LAG-3, NKG2A, OX40, PD-1/PD-L1/PD-L2, TIGIT, TGFR-beta, TNFR2, VISTA și/sau 2B4. În anumite

variante de realizare, agentul este un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia care se leagă la una dintre moleculele de mai sus.

În anumite aspecte, anticorpii și porțiunile de legare la antigen, compozițiile, și moleculele de legare bi-specifice din invenției se pot administra în combinație cu alt inhibitor al căii TIM-3, care poate ținti TIM-3 sau unul sau mai mulți dintre liganzii săi. Exemplele de astfel de inhibitori includ alți anticorpi anti-TIM-3 și anticorpi care țintesc liganzi TIM-3 și/sau co-receptori cum ar fi galectina-9, HMGB-1, lipidele fosfatidilserinei, CEACAM1, LILRA1-6, sau LILRB1-5.

Se înțelege că compozițiile de anticorpi, moleculele de legare bi-specifice, și anticorpii și porțiunile de legare la antigen ale acestora din invenție pot fi pentru utilizare într-un tratament așa cum este descris în acest document.

Doza și calea de administrare

Compozițiile de anticorpi din invenție vor fi administrate într-o cantitate eficientă pentru tratamentul afecțiunii în cauză, adică la doze și pentru perioade de timp necesare pentru a obține un rezultat dorit. O cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic poate varia în funcție de factori precum afecțiunea particulară care este tratată, vârsta, sexul și greutatea pacientului, și dacă anticorpii sunt administrați ca un tratament de sine stătător sau în combinație cu unul sau mai multe tratamente pentru cancer suplimentare.

Regimurile de dozare pot fi ajustate pentru a furniza răspunsul optim dorit. Pentru exemplificare, poate fi administrat un singur bolus, pot fi administrate mai multe doze divizate pe parcursul timpului sau doza poate fi redusă sau mărită proporțional după cum indică exigențele situației terapeutice. Este deosebit de avantajos să se formuleze compoziții parenterale în formă de unitate de dozare pentru ușurința administrării și uniformitatea dozării. Forma unitară de dozare, așa cum este utilizată în acest document, se referă la unități fizice discrete potrivite ca doze unitare pentru pacienții/subiecții care urmează să fie tratați, fiecare unitate conținând o cantitate predeterminată de compus activ calculată pentru a produce efectul terapeutic dorit în asociere cu transportorul farmaceutic necesar. Specificațiile pentru formele unitare de dozare din invenție sunt dictate în general de, și dependente în mod direct de (a) caracteristicile unice ale agentului chimioterapeutic și efectul terapeutic sau profilactic particular care trebuie atins, și (b) limitările inerente în domeniul de specialitate al compunerii unui astfel de compus activ pentru tratamentul sensibilității la indivizi.

Prin urmare, specialistul în domeniu va aprecia, pe baza descrierii furnizate în acest document, că doza și regimul de dozare sunt ajustate în conformitate cu metode binecunoscute în domeniile de specialitate terapeutice. Adică, doza maximă tolerabilă poate fi stabilită cu ușurință, iar cantitatea eficientă care oferă un beneficiu terapeutic detectabil unui pacient poate fi determinată, de asemenea, la fel ca și cerințele temporale pentru administrarea fiecărui agent pentru a oferi pacientului un beneficiu terapeutic detectabil. În consecință, în timp ce anumite doze și regimuri de administrare sunt exemplificate în acest document, aceste exemple nu limitează în nici un fel doza și regimul de administrare care pot fi furnizate unui pacient în practicarea prezentei invenții.

Trebuie remarcat faptul că valorile dozelor pot varia în funcție de tipul și severitatea afecțiunii care trebuie atenuată, și se pot include doze unice sau multiple. Trebuie să fie înțeles în continuare că pentru orice subiect particular, regimurile de dozare specifice trebuie ajustate pe parcursul timpului în conformitate cu nevoia individuală și raționamentul profesional al persoanei care administrează sau supraveghează administrarea compozițiilor, și că intervalele de dozare stabilite în acest document sunt numai cu titlu de exemplu și nu au scopul de a limita domeniul de aplicare sau utilizarea compoziției încorporate. Mai mult decât atât, regimul de dozare cu compozițiile din această invenție poate fi bazat pe o varietate de factori, inclusiv tipul de boală, vârsta, greutatea, sexul, starea medicală a pacientului, severitatea afecțiunii, calea de administrare, și anticorpii particular utilizați. Prin urmare, regimul de dozare poate varia mult, dar poate fi determinat în mod curent folosind metode standard. Pentru exemplificare, dozele pot fi ajustate pe baza parametrilor farmacocinetici sau farmacodinamici, care pot include efecte clinice, cum ar fi efectele toxice, și/sau valori de laborator. Prin urmare, prezenta invenție cuprinde escaladarea dozei intra-pacient așa cum este determinată de un specialist în domeniu. Determinarea dozelor și regimurilor corespunzătoare este binecunoscută în domeniul relevant și va fi înțeles că este avută în vedere de către specialistul în domeniu, odată furnizate expunerile făcute cunoscute în acest document.

Se are în vedere că o doză adecvată dintr-o compoziție de anticorp din invenție va fi în intervalul 0,1-100 mg/kg, cum ar fi aproximativ 0,5-50 mg/kg, de ex., aproximativ 1-20 mg/kg. Compoziția de anticorpi poate fi administrată, pentru exemplificare, într-o doză de cel puțin 0,25 mg/kg, de ex., cel puțin 0,5 mg/kg, cum ar fi cel puțin 1 mg/kg, de ex., cel puțin 1,5 mg/kg, cum ar fi cel puțin 2 mg/kg, de ex., cel puțin 3 mg/kg, cum ar fi cel puțin 4 mg/kg, de ex., cel puțin 5 mg/kg; și de ex., până la cel mult 50 mg/kg, cum ar fi până la cel mult 30 mg/kg, de ex., până la cel mult 20 mg/kg, cum ar fi până la cel mult 15 mg/kg. Administrarea va fi repetată, în mod normal, la intervale adecvate, de ex., o dată la fiecare săptămână, o dată la fiecare două săptămâni, o dată la fiecare trei săptămâni, sau o dată la fiecare patru

săptămâni, și atât timp cât este considerat necesar de către medicul responsabil, care poate crește sau micșora opțional dozarea după cum este necesar.

O cantitate eficientă pentru terapia tumorală poate fi măsurată prin capacitatea sa de a stabili progresia bolii și/sau de a ameliora simptomele la un pacient, și preferabil de a inversa progresia bolii, de ex., prin reducerea dimensiunii tumorii. Capacitatea unui anticorp, unei porțiuni de legare la antigen, unei molecule de legare bi-specifice, sau unei compoziții din invenție de a inhiba cancerul poate fi evaluată prin analize *in vitro*, de ex., așa cum este descris în exemple, precum și în modele animale adecvate care sunt predictive pentru eficacitate în tumorile umane. Regimurile de dozare adecvate vor fi selectate pentru a oferi un răspuns terapeutic optim în fiecare situație particulară, pentru exemplificare, administrate ca un singur bolus sau ca o perfuzie continuă, și cu posibila ajustare a dozei așa cum este indicat de exigențele fiecărui caz.

Compoziții și utilizări pentru diagnosticare

Anticorpul și porțiunile de legare la antigen din prezenta invenție sunt utile, de asemenea, în procesele de diagnosticare (de ex., *in vitro*, *ex vivo*). Pentru exemplificare, anticorpul și porțiunile se pot utiliza pentru a detecta și/sau măsura nivelul de TIM-3 într-o probă de la un pacient (de ex., o probă de țesut, sau o probă de fluid corporal, cum ar fi un exudat inflamator, sânge, ser, lichid intestinal, salivă, sau urină). Metodele adecvate de detectare și măsurare includ metode imunologice cum ar fi citometria în flux, analizele imunosorbente legate de enzime (ELISA), analizele de chimioluminescență, radioimunoanaliza, și imunohistologia. Invenția cuprinde suplimentar kituri (de ex., kituri de diagnostic) care cuprind anticorpul și porțiunile de legare la antigen descrise în acest document.

Cu excepția cazului în care sunt definiți în alt fel în acest document, termenii științifici și tehnici utilizați în legătură cu prezenta invenție vor avea semnificațiile care sunt înțelese în mod obișnuit de cei care au pregătire obișnuită în domeniul de specialitate. Metode și materiale cu titlu de exemplu sunt descrise mai jos, cu toate că metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise în acest document pot fi utilizate, de asemenea, în practica sau testarea prezentei invenții. În caz de conflict, prezenta descriere, inclusiv definițiile, va avea prioritate.

În general, nomenclatura utilizată în legătură cu, și tehnicile de cultură celulară și tisulară, biologie moleculară, imunologie, microbiologie, genetică, chimie analitică, chimie organică sintetică, chimie medicinală și farmaceutică, și chimia și hibridizarea proteinelor și acizilor nucleici descrise în acest document sunt cele bine cunoscute și utilizate în mod obișnuit în domeniul de specialitate. Reacțiile enzimatică și tehnicile de purificare sunt efectuate în conformitate cu specificațiile producătorului, așa cum se realizează în mod obișnuit în domeniul de specialitate sau așa cum este descris în acest document.

Mai mult decât atât, cu excepția cazului în care este cerut în alt fel de context, termenii la singular vor include pluralități, iar termenii la plural vor include singularul. De la un capăt la altul al acestei descrieri și în variantele de realizare, cuvintele "a" și "cuprind" sau variații precum "are", "având", "cuprinde", sau "cuprinzând" vor fi înțelese ca implicând includerea unui număr întreg sau grup de numere întregi declarat, dar nu excluderea oricărui alt număr întreg sau grup de numere întregi.

Cu toate că în acest document este citat un număr de documente, această citare nu constituie o admitere a faptului că oricare dintre aceste documente face parte din cunoștințele generale comune în domeniul de specialitate.

Pentru ca această invenție să fie mai bine înțeleasă, sunt prezentate următoarele exemple.

EXEMPLE

Exemplul 1: Clonarea anticorpilor anti-TIM-3 din celulele B de șobolan

Acest exemplu descrie metoda utilizată pentru generarea anticorpilor anti-TIM-3 uman din invenție. Sunt furnizate, de asemenea, secvențele de ADN și de aminoacizi ale anticorpilor.

Materiale și metode

Anticorpul anti-TIM-3 din invenție au fost izolați dintr-un repertoriu de anticorpi derivați de la șobolani OmniRat® (Osborn și colab., J Immunol., 190(4): 1481-90 (2013)), o tulpină de șobolan de la OMT (Open Monoclonal Technology, Inc.) care produce anticorpi cu idiotipuri complet umane. Clonarea genelor de anticorpi derivate de la șobolan din celulele B secretoare de anticorpi (ASC) sortate unicelular a fost realizată prin intermediul tehnologiei de descoperire a anticorpilor Symplex™ (Meijer și colab., J Mol Biol, 358(3): 764-72 (2006)).

O bibliotecă de anticorpi Symplex™ a fost preparată din celule B sortate unicelular din șobolani OmniRat® imunizați, biblioteca conținând perechi de codificare VH și VL înrudite pentru fiecare celulă B sortată. Construcțiile de repertoriu de anticorpi care codifică imunoglobuline complet umane în format IgG1 sau IgG2 au fost transfectate în celule Expi293, și supernatanții celulari au fost evaluați pentru proprietățile de legare într-un format de mare randament. Potrivirile de succes ale screening-ului au fost analizate prin secvențiere de ADN și au fost extrase secvențele de ADN care codifică anticorpi. Clonele de anticorpi selectate au fost exprimate și testate din punct de vedere funcțional așa cum este descris mai jos. Tabelul 1 arată secvențele de acid nucleic din domeniul variabil al lanțului greu și ușor ale clonei de anticorp 15086.15086. Tabelul 2 arată secvențele de aminoacizi ale lanțului greu și ușor pentru respectiva

clonă de anticorp, iar Tabelul 4 arată secvențele de aminoacizi ale CDR ale lanțului greu și ușor. Tabelul 3 arată secvențele de aminoacizi ale regiunii constante a lanțului greu IgG1 și regiunii constante a lanțului ușor kappa.

Datorită utilizării primerilor degenerați în clonarea Symplex™ a fragmentelor de ADN care codifică anticorpi, un număr de mutații cu sens greșit (missense) în capetele amino terminale ale lanțurilor grele și ușoare a fost corectat pentru anumiți anticorpi (de ex., anticorpii 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144). Tabelul 5 arată secvențele domeniului variabil al lanțului greu și ușor la nivel de ADN din anticorpii optimizați desemnați 15086.16837, 15086.17145, sau 15086.17144 (aceste trei variante diferă în subtipul de izotip, dar au secvențe de domeniu variabil al lanțului greu și ușor identice). Procesul de optimizare include potrivirea corecției amino terminale cu linia germinală, precum și optimizarea utilizării codonilor. Țintele pentru potrivirea cu secvențele liniei germinale umane au fost IGHV4-31 pentru domeniile variabile ale lanțului greu și IGKV3-11 pentru domeniile variabile ale lanțului ușor.

Au fost identificați anticorpi suplimentari care definesc diferite bin-uri de epitopi. Secvențele de domeniu variabil al lanțului greu și ușor ale acestor anticorpi sunt arătate în Tabelul 9 și Tabelul 10. Au fost identificați anticorpi funcționali suplimentari, iar secvențele domeniului variabil al lanțului greu și ușor ale acestora sunt arătate în Tabelul 12 și Tabelul 13.

Rezultate

Tabelul 1 prezintă secvențele ADN care codifică anticorpii 15086.15086 clonați cu Symplex™.

Tabelul 1: Secvențele ADN ale domeniilor variabile ale anticorpului 15086.15086 clonat cu Symplex™

	Secvență (5' la 3')
Secvență ADN VH (SECV ID NR: 1)	CAGGTGCAGCTACAGCAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCTGTCCCT
	CACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGTTGGACCC GTCAGCACCCAGGGATGGGCCTGGAGTGGATTGGATACATCTCTTACAGTGGGAGTATC TATTACACTCCGTCCCTCAAGAGTCGACTTACCATATCAGTGGACACGTCTAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA GTTTGGATTCTGGGGATCTAACCGTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCGAGT
Secvență ADN VL (SECV ID NR: 2)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA GCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAAGATTTGTCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTTCG GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATTAAG

Tabelul 2 prezintă secvențele de proteine deduse ale anticorpului 15086.15086 clonat cu Symplex™ original. CDR-urile sunt arătate cu caractere aldine și italice.

Tabelul 2: Secvențele de proteine ale domeniilor variabile ale anticorpului 15086.15086 clonat cu Symplex™

	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
Secvența de proteină VH (SECV ID NR: 3)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCTVS <i>GGSISSGGYY</i> WSWTRQHPGMGLEWIGY <i>ISYSGS</i> <i>IYYT</i> PSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY <i>CASLDSWGSNRDYWG</i> QGTILV TVSS
Secvența de proteină VL (SECV ID NR: 4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <i>QSVSSY</i> LAWYQQKPGQAPRLLIY <i>DAS</i> NRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYY <i>CQQRSNWPLTF</i> GGGKVEIK

Tabelul 3 prezintă regiunile constante ale lanțului greu și ușor.

Tabelul 3: Secvențele de proteine ale regiunilor constante

	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG1 (SECV ID NR: 5)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Regiunea constantă Kappa a lanțului ușor (SECV ID NR: 6)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabelul 4 prezintă regiunile de determinare a complementarității (CDR-uri) ale lanțului greu și ușor partajate de anticorpii 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144. Secvențele CDR au fost determinate în acest document în conformitate cu definițiile IMGT® pentru CDR1 și CDR2. Pentru CDR3 de lanț greu și ușor, definițiile din acest document includ un reziduu de aminoacid suplimentar în amonte de IMGT-CDR3 (Cys) și un reziduu de aminoacid suplimentar în aval (Trp pentru CDR3 din VH, Phe pentru CDR3 din VL).

Tabelul 4: Secvențele de proteine ale CDR-urilor anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144

Regiune	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
HCDR1 (SECV ID NR: 7)	GGSISSGGYY
HCDR2 (SECV ID NR: 8)	ISYSGSI
HCDR3 (SECV ID NR: 9)	CASLDSWGSNRDYW
LCDR1 (SECV ID NR: 10)	QSVSSY
LCDR2 (SECV ID NR: 11)	DAS
LCDR3 (SECV ID NR: 12)	CQQRSNWPLTF

Tabelul 5 prezintă secvențe ADN optimizate care codifică domeniile variabile ale lanțului greu și ușor partajate de anticorpii 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144.

Tabelul 5: Secvențele ADN optimizate care codifică domenii variabile ale anticorpilor 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144

	Secvență (5' la 3')
Secvență ADN VH (SECV ID NR: 13)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGTGGCCCCGGACTGGTCAAGCCTTCACAGACTCTGAGCCTGACCTGCACAGTGTCTGGCGGAAGTATCAGCTCCGGGGGTACTATTGGAGCTGGACCCGACAGCACCCAGGAATGGGTCTGGAATGGATCGGGTACATTTTCATATAGCGGCTCCATCTACTATACACCCTCACTGAAAAGCAGGCTGACCATTTCCGTGGACACATCTAAGAACCA GTTCAGCCTGAAACTGTCTAGTGTGACAGCCGCTGATACTGCAGTCTACTATTGTGCCT CCTGGACTCTTGGGGCAGTAATAGAGATTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCCACCGTCTCGAGT
Secvență ADN VL (SECV ID NR: 14)	GAGATCGTGCTGACTCAGTCCCCAGCCACCCTGTCACTGAGCCCAGGAGAACGAGCAAC CCTGTCTTGACAGGGCCCTCCAGTCTGTGAGCTCCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGC CCGGGCAGGCACCTCGACTGCTGATCTACGACGCCAGTAACAGAGCTACCGGTATTCCC GCCCGCTTCAGTGGTTGAGGCAGCGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCTAGTCTGGA GCCTGAAGATTTCGCCGTGTACTATTGTGACAGAGGTCTAATTGGCCACTGACATTTG GCGGAGGGACTAAGGTCGAGATCAAG

Tabelul 6 prezintă secvențele de proteine din domeniul variabil al lanțului greu și ușor deduse partajate de anticorpii 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144. CDR-urile sunt arătate cu caractere

aldine și italice. Trebuie reținut faptul că secvența de proteină VL este aceeași ca secvența de proteină VL neoptimizată.

Tabelul 6: Secvențele de proteine ale domeniilor variabile ale anticorpilor optimizați 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144

	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
Secvența de proteină VH (SECV ID NR: 15)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GGSISSGGYY WSWTRQHPGMGLEWIGY ISYSGSI YYTPSLKSRLLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CASLDSWGSNRDYWG QGTTLVTVSS
Secvența de proteină VL (SECV ID NR: 4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQKPGQAPRLLIY DASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYY CQQRSNWPLTF GGGKVEIK

5

Tabelul 7 prezintă secvențele ADN care codifică regiunile constante de anticorpi în diferite formate de izotip.

Tabelul 7: Secvențele ADN care codifică regiuni constante de anticorpi în diferite formate de izotip

	Descriere	Secvență (5' la 3')
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG1-LALO (SECV ID NR: 16)	Regiunea constantă a lanțului greu de IgG1-LALO excluzând intronii	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCC ACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT TCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGACGCGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAACACAGGTGTACACCCCTGCCC CCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGACAAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT AAA
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG1-LALO (SECV ID NR: 17)	Regiunea constantă a lanțului greu de IgG1-LALO incluzând intronii	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGC TGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCA GTCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGCTGTGCTCTTCAACCG GAGGCCTCTGCCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGC

	Descriere	Secvență (5' la 3')
		TTTTCCTCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACC GGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAG CCATATCCGGGAGGACCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGG CAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATT CCAGTAACCTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGC CCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAG GGACAGGCCCCAGCCGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCT CAGCACCTGAAgcccgggggacCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG CGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGCTCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGC TCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTC CCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATC CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAAACCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCGGGTAAA
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG4 (S228P) (SECV ID NR: 18)	Regiunea constantă a lanțului greu de IgG4 (S228P) excluzând intronii	GCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAG GAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGA AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCAcCATGCC AGCACCTGAGTTCTTGGGGGGACCATCAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGC GTGGTGGTGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTG GTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGG AGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTC CTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG4 (S228P) (SECV ID NR: 19)	Regiunea constantă a lanțului greu de IgG4 (S228P) incluzând intronii	GCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAG GAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGA AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGC TGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCTGCTGGACGCAACCCGGCTGTGCA GCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCTCACCCG GAGGCCTCTGACCACCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGA TTTTTCCACAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTACCCC AGGCCCTGaGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGA GCCATATCCGGGAGGACCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGG CCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCTCCAGAT

	Descriere	Secvență (5' la 3')
		CTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCC CATGCCCAcCATGCCAGGTAAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGC TCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC CCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCT GAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCTCCCAAAACCCAA GGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCTCTCCGTCTCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGG GACCCACGGGGTGCAGGGGCCACATGGACAGAGGTGAGTCTGGCCCA CCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCTCTACAGG GCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTC TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGA GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAGGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAG GGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG2 (SECV ID NR: 20)	Regiunea constantă a lanțului greu de IgG2 excluzând intronii	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAG GAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCC AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCACCCGTGCCC AGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGG AGCAGTTCAACAGCACGTTCGGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGTGTG CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAACCAAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGG AGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG2 (SECV ID NR: 21)	Regiunea constantă a lanțului greu de IgG2 incluzând intronii	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAG GAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCC AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGACAGTTGGTGAGAGGCCAGCTCAGGGAGGGAGGCTGTCTGC TGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCTGCTGGACGCACCCCGGCTGTGCA GCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCTCTACCCG GAGGCTCTGCCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGCTCTTCTGGC TTTTTCCACAGGCTCCAGGCAGGCACAGGCTGGGTGCCCTACCCC AGGCCCTTCACACACAGGGGCAGGTGCTTGGCTCAGACCTGCCAAAA GCCATATCCGGGAGGACCTGCCCCGTGACCTAAGCCGAGCCCAAGG CCAAACTGTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCTCCAGAT CCGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCGCAAATGTTGTGTG AGTGCCACCGTGCCAGGTAAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGC TCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC CCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCA

	Descriere	Secvență (5' la 3')
		CCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGA CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTT CAACAGCACGTTCCTGTGGTCAAGGTCTCACCCTTGTGCACCAAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGC CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCAAAGGTGGGAC CCCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGGCCACCC TCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAC CCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
Regiunea constantă a lanțului ușor (SECV ID NR: 22)		CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Tabelul 8 prezintă secvențele de proteine ale regiunilor constante de anticorpi în diferite formate de izotip.

Tabelul 8: Secvențe de proteine ale regiunilor constante de anticorpi în diferite formate de izotip

	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG1-LALO (SECV ID NR: 23)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTCPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG4 (S228P) (SECV ID NR: 24)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Regiunea constantă a lanțului greu de IgG2 (SECV ID NR: 25)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKCCVECPPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

Tabelul 9 prezintă secvențele ADN care codifică domeniile variabile ale lanțului greu și ușor ale anticorpilor anti-TIM-3 utilizați pentru binning-ul epitopilor.

Tabelul 9: Secvențele ADN ale domeniilor variabile ale anticorpilor de binning anti-TIM-3

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
20131	26	

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
VH		CAGGTGCAGCTACAGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTAAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGT GGTAGCACATAACAACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA ATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGCGAAAATTTTGGGTCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCTGGTCACAGTCTCGAGT
20131 VL	27	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGG CCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAA CTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTAC TGGACATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTAACCATTAGTGGCAGCGGGTCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTA TTACTGTCAGCAATATTATAGTGGTCCCTCCGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTG GAAATCAAA
20293 VH	36	ACGTGACAGGGCGCGCCAGGTCCAGCTGCAGGAGAGCGGTCCCGGACTGGTGAA GCCATCCCAGACACTGAGCCTGACTTGTACTGTGAGCGGCGGTAGCATCTCCAGC GGCGGCTACTATTGGTCTGGATCAGGCAGCACCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGA TCGGCTACATCTACTATAGCGGCTCTATCTACTATAACCCTTCCTGAAGACCCG GGTGACCATCTCTGTGGACACATCCAAGAATCAGTTCTATCTGAAGCTGTCTTCC GTGACCGCCGCTGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCTCACTGATGGTCTGGGGG TCATGGGCGATTACTGGGGGCAGGGCACACTGGTCACAGTCTCGAGT
20293 VL	37	GAGATTGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCACCCTGTCTCTGAGTCTTGGCGAGAGAG CCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCCAGCTATCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCCGGCTGCTGATCTACGATGCCTCCAATAGAGCC ACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGA CCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCGGTC CGACTGGCCTCCTACATTTGGCCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
15105 VH	46	CAGGTACCTTGAAGGAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAGGCCCTCGGAGACCCTGT CCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATAGGGGAAATCAATCATAGTGGA AGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACGCGA CCAAGAAACAATTCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGATATTGGGAGCTCCCTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTG GTCACCGTCTCGAGT
15105 VL	47	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCA CAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAA TAGTTACCCCTCCGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAG
15107 VH	56	CAGATGCAGCTGGTGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT CCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGA AGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTGAGTTGACACGT CCAAGCACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGATGGTGGGAGCTTCTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTG GTCACCGTCTCGAGT
15107 VL	57	

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
		GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCA CAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAA TAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAG
15109 VH	66	CAGATGCAGCTGGTGCAATGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT CCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAAATCAATCATAGTGGA AGCACCAACTACAACCCGCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGGTTTTACTATGCTCCGAACCTTGACTACTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
15109 VL	67	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGACAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAA TAGTTATTCCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
15174 VH	76	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAATTACTACTGGGG CTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAT AGTGGGAACACCTACTACAACCCGCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAG ACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGACAGACAC GGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAGACAGTGGCTGGCCCCCTCTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
15174 VL	77	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAA TAGTTATTCACTTCTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGATATCAAG
15175 VH	86	CAGGTCCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA AGGTCTCCTGCAAGGCTGCTGGATACACCTTAACCGGCTACTATATGCACTGGGT GCGACAGGCCCTGGACAAGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCTAACAGT GGTGGCTCAAACAATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGCACA CGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGTCCCCCTGTATAGCAGTGGCTGGTACGAGGGT GCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT
15175 VL	87	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGTTGGTTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAA TAGTTATTCTCCGGGGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAG
15260 VH	96	

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
		CAGATGCAGCTACAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTGCTGGAA CTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTAC AGGTCCAAGTGGTATTCTGCTTTTGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCA ACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACCTCTGTGACTCCCGA GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAGGGTAGCAGTGGCTGGTACGGATAC GTCCACCACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGT
15260 VL	97	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGTATCTCTGGGAGAACTG TCACCATCGAATGTCGAGCAAGTGAAGACATTTACAATGGTTTAGCATGGTATCA GCAGAAGCCAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAATAGCTTGCAT
		ACTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACACAGTATTCTCTCA AGATAAACAGCCTGCAATCTGAAGATGTCGCAAGTTATTTCTGTCAACAGTATTA CGATTATCCTCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAA
15284 VH	106	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCTTCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGG CTGGATCCGCCAGCCCCCTGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGATCTTCTATTAT AGTGGGACCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGCAC ACACGTCCAAGAGCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACAC GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGAGAATATTTGACCGGTTACTCCCCTTT GACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT
15284 VL	107	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCATCCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCA GCAAAAACAGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGGAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCA CAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAA TAGTTACCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
15299 VH	116	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTGGTGGTAGTGGT GGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACA ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGTGAAAGATGGGGCAGGAGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGA ACCTGGTCAACCGTCTCGAGT
15299 VL	117	GATATTGTGATGACGCAGTCTTCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTATAAATCATTTAGGCTGGTATCA GCATAAACAGGAAAGCCCCCTAATCGCCTAATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCA CAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACGGCATAA TAGTTACCCCTCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAG
15353 VH	126	CAGGTGCAGCTACAGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGT CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACAGTGGTGGTCACTACTGGAG CTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTAC AGTGGGAGCATCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTTACCATATCAGTAG ACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACAC GGCCGTGTATTACTGTGCGAGTTATTACTATGCCAGTAGTGGTGATGCTTTTGAT ATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT
15353 VL	127	

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
		GAAACGACACTCAGCGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG CCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAG CAACTGGCCTCCGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA
15354 VH	136	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAATTATGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTCTGGT GGTAGCAGATTCTTCGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACA ATTCCAAGAGCACGCTGTATCTGCAAACGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGCGAAAGGGGGCCCGTTGTATACTGGAACGACGGTGTGGT TTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGCTCGAGT
15354 VL	137	GAAATTGTGTTGACGCGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG CCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCA GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACAGGGCC ACTGGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCACTTTATTACTGTCAGCAGTATGA TAACTGGCCTCCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA
17244 VH	146	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGACGCTCTGGATTACCTTCAGTACTACTACATGACCTGGAT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATACATTAGTGGTGGT GGTTCCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGACA ACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTTTATTTCTGTGCGAGAGGGAAGTGGGGATCGGCGGCTCTTGATATCTGGGC CAAGGGACAATGGTCACGGTCTCGAGT
17244 VL	147	GAAATTGTGTTGACGCGAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGGCATTAAACAATTATTTAGCCTGGTTTCA GCAGAAACAGGGAGAGCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCGAAGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAA TAGTTACCCCTCCAACCTCTCGGCCCTGGGACCAACGTGGATATCAAA
17245 VH	156	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTGGTGGTAGTGGT GGTAGCGCATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACA ATTTCCAAGAACAGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGTGAAGATGGGGCAGGAGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGC ACCTTGGTCACCGTCTCGAGT
17245 VL	157	GACATCCAGTTGACCCAGTCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATCATTTAGGCTGGTATCA GCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCCTAATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCA CAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAA TAGTTACCCCTCCGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAG

Tabelul 10 prezintă secvențele de proteine din domeniul variabil al lanțului greu și ușor deduse ale anticorpilor anti-TIM-3 utilizați pentru binning-ul epitopilor. CDR-urile sunt arătate cu caractere albine și italice.

5 **Tabelul 10: Secvențe de proteine ale domeniilor variabile ale anticorpilor de binning anti-TIM-3**

Ab	SECV ID NR:	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
20131 VH	28	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTLSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSG ISGS GGST YNADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYY CAKIFGSYYFDYW GGGTLTVSS
20131 VL	29	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLI Y WTST RESGVPNRFSGSGSGTDFTLTITSSLAEDVAVYY CQQYSGPPTFG QGT KVEIK
20293 VH	38	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GGSISSGGYY WSWIRQHPGKGLEWIGY IY YSGSI YNNPSLKSRTISVDTSKNQFYLKLSVTAADTAVYY CASLMVWGVMGD YW GGTTLTVSS
20293 VL	39	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY DASNR ATGIPAREFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYY CQQRSDWPPTF QGTKVEIK
15105 VH	48	QVTLKEWGAGLLRPSETLSLTCAVY GGSTSGYY WSWIRQPPGKGLEWIGE INHS GST NYNPSLKSRTISVDATKKQFSLKLTSSVTAADTAVYY CARYWELPDYW GGG TLTVSS
15105 VL	49	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS QGIRNDL GWYQQKPGKAPKRLIY AASSL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYY CLQHNSYPPTFG QGTKVEIK
15107 VH	58	QMQLVQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSTSGYY WSWIRQPPGKGLEWIGE INHS GST NYNPSLKSRTMSVDTSKHQFSLKLTSSVTAADTAVYY CARWWELPDYW GGG TLTVSS
15107 VL	59	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS QGIRNDL GWYQQKPGKAPKRLIY AASSL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYY CLQHNSYPWTF QGTKVEIK
15109 VH	68	QMQLVQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSTSGYY WSWIRQPPGKGLEWIGE INHS GST NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLTSSVTAADTAVYY CARFYAPNFDYW GGTTLTVSS
15109 VL	69	EIVLTQSPSTLSASVGDRVITTCRAS QSISSW LAWYQQKPGTAPKLLIY KASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYY CQQYNSYSTF GGGKVEIK
15174 VH	78	QVQLQQSGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSNYY WGWIRQPPGKGLEWIGS IY YSGNT YNNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLTSSVTAADTAVYY CARQTVAGPLFD YW GGTTLTVSS
15174 VL	79	EIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCRAS QSISSW LAWYQQKPGKAPKVLIIY KASSL ESGVPSRFSGSGSGTELTITSSLPDDFATYY CQQYNSYSTFTF GPGTKVDIK
15175	88	

Ab	SECV ID NR:	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
VH		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAA GYTLTGYY MHWVRQAPGQGLEWMGR INPN SGGS NNAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CAREGLYSSGWY EGAFDIW GQGTMTVTVSS
15175 VL	89	EIVMTQSPSTLSASVGDRVITITCRAS QSISSW LAWYQQKPGKAPKLLIY KASSL ESGVPSR FGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYY CQQYNSYSPGLTF GGGKVEIK
15260 VH	98	QMQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAIS GDSVSSNSA AWNWRQSPSRGLEWLGR TY YRSKWYS AFVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYY CAREGSSGWY GYVHHW GQGTMTVTVSS
15260 VL	99	EIVLTQSPASLSVSLGETVTIECRAS EDIYNG LAWYQQKPGKSPQLLIY NANSL HTGVPSR FGSGSGTQYSLKTNISLQSEDFASYF CQQYDYPPTF GQGTKVEIK
15284 VH	108	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GGSFSSSSYY GWIRQPPGKGLEWIGI FY YSGTTY YNPSLKSRTVISAHTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYY CARGGEYFDRLL PFDYW GQGTMTVTVSS
15284 VL	109	EIVMTQSPSFLSASVGDRVITITCRAS QGLISSY LAWYQQKPGKAPKLLIY AASTL ESGVPSR FGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CQQLNSYPFTF GPQTKVDIK
15299 VH	118	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFS SYAMSWVRQAPGKLEWVSA IGGS GGST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVKDGAGGF DIWYGQGTMTVTVSS
15299 VL	119	DIVMTQSSSSLSASVGDRVITITCRAS QGIINHL GWYQHKPGKAPNRLIY AASSL QSGVPSR FGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLRHNS YPPTF GQGTKVEIK
15353 VH	128	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCTVS GGINS GGHYWSWIRQHPGRGLEWIGY IY YSGSI YYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CASYYYASSGDA FDIW GQGTMTVTVSS
15353 VL	129	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLIY DASNR ATGIPAR FGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTF GQGTKVEIK
15354 VH	138	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFS NYAMSWVRQAPGKLEWVSA ISGR GGST TFADSVKGRFTISRDNKSTLYLQTNLSLRAEDTAVYY CAKGGPLYNWNDG DGFDIW GQGTMTVTVSS
15354 VL	139	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSN LAWYQQKPGQAPRLIY GASTR ATGIPAR FGSGTGSFTFTLTISSLQSEDFALYY CQQYDNWPPWTF GQGTKVEIK
17244 VH	148	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFS DYYMTWIRQAPGKLEW ISYISGG GGSI YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYF CARGNWGSAA LDI WGQGTMTVTVSS

Ab	SECV ID NR:	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
17244 VL	149	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS QG INNYLAWFQQKPGRAPKSLIY A ASSL QSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPPTL GPGTNVDIK
17245 VH	158	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSA IGGS GG SAYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVKDGAGGF DIWG QGTLLTVSS
17245 VL	159	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS QG IRNHLGWYQQKPGKAPKRLIY A ASSL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLQHNSYPPTTF GQGTKVEIK

Tabelul 11 prezintă CDR-urile anticorpilor de binning anti-TIM-3. SECV ID NR. pentru CDR-uri sunt arătate sub fiecare secvență. Secvențele CDR au fost determinate în acest document în conformitate cu definițiile IMGT® pentru CDR1 și CDR2. Pentru CDR3 de lanț greu și ușor, definițiile din acest document includ un reziduu de aminoacid suplimentar în amonte de IMGT-CDR3 (Cys) și un reziduu de aminoacid suplimentar în aval (Trp pentru CDR3 din VH, Phe pentru CDR3 din VL).

Table 11: Protein sequences of CDRs of anti-TIM-3 binning antibodies

Antibody	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
20131	GFTLSSYA	ISGSGGST	CAKIFGSYYFDYW	QSVLYSSNNK NY	WTS	CQQYYSGPPTF
	30	31	32	33	34	35
20293	GGSISSGGY Y	IYYSGSI	CASLMVWGVMGDYW	QSVSSY	DAS	CQQRSDWPPTF
	40	41	42	43	44	45
15105	GGSFSGYY	INHSGST	CARYWELPDYW	QGIRND	AAS	CLQHNSYPPTF
	50	51	52	53	54	55
15107	GGSFSGYY	INHSGST	CARWELPDYW	QGIRND	AAS	CLQHNSYPPTF
	60	61	62	63	64	65
15109	GGSFSGYY	INHSGST	CARFYYPNFDYW	QSISSW	KAS	CQQYNSYSTF
	70	71	72	73	74	75
15174	GGSISSSNY Y	IYYSGNT	CARQTVAGPLFDYW	QSISSW	KAS	CQQYNSY3FTF
	80	81	82	83	84	85
15175	GYTLTGY	INPNSGGS	CAREGPLYSSGWYEGAFD IW	QSISSW	KAS	CQQYNSYSPGL TF
	90	91	92	93	94	95
15260	GDSVSSNSA A	TYYSKWS S	CAREGSSGWYGVHHW	EDIYNG	NAN	CQQYYDYPPTF
	100	101	102	103	104	105
15284	GGSFSSSY Y	FYYSGTT	CARGGEYFDRLLPFDYW	QGISSY	AAS	CQQYNSYPPTF
	110	111	112	113	114	115
15299	GFTFSSYA	IGGSGGST	CVKDGAGGF	QGIINH	AAS	CLRHNSYPPTF
	120	121	122	123	124	125

15353	GGINSGGH Y	IYYSGSI	CASYYYASSGDAFDIW	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPPTF
	130	131	132	133	134	135
15354	GFTFSNYA	ISGRGGST	CAKGGPLYNWNDGDFDI W	QSVSSN	GAS	CQQYDNWPPTF F
	140	141	142	143	144	145
17244	GFTFSDYY	ISGGGSI	CARGNWGSAALDIW	QGINNY	AAS	CQQYNSYPPTL
	150	151	152	153	154	155
17245	GFTFSSYA	IGSGGSA	CVKDGAGGFDYW	QGI RNH	AAS	CLQHNSYPPTF
	160	161	162	163	164	165

Tabelul 12 prezintă secvențele ADN care codifică domeniile variabile ale lanțului greu și ușor ale anticorpilor anti-TIM-3 suplimentari identificați ca anticorpi funcționali. Secvențele pentru anticorpii funcționali 20131 și 20293 sunt prezentate în Tabelul 9 de mai sus.

5 **Tabelul 12: Secvențele ADN ale domeniilor variabile ale anticorpilor anti-TIM-3 funcționali suplimentari**

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
19324 VH	166	CAGATGCAGCTACAGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCTAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGT GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGA GACAATCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGATAGTGGGAGCTACCCACTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCTGGTCACGGTCTCGAGT
19324 VL	167	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG GCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTCTTATACAGCTCCAACAATTAAG AACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATT TACTGGGCATCTACCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGG TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCA GTTTATTACTGTGCAATATTATAGTGGTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACA CGACTGGAGATTAAG
19416 VH	176	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTG TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACAGTGGTGGTTACTACTGG AGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTAT TACAGTGGGAGCATCTACTACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGACTTACCATATCA GTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCG GACACGGCCGTTTATTACTGTGCGACTCCTTATTACTATGGTTCGGGAGTTAT GGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCGAGT
19416 VL	177	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA GCCACCTCTCCTGCAAGGGCCAGTCAAGTGTAAACAACACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGG GCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAG CGTAGCAACTGGCCCATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
19568 VH	186	CAGATGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTCAGACCCTG TCCCTCACCTGCACTGTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGTGGTTACTACTGG AACTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCTGGAGTTCATTGGGTACATCTAT
		TACAGTGGGAGCATCTACTACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCC GTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCG GACACGGCCCTATATTACTGTGCGAGCGTCGGTATAGTGGGAGCCTCTACTTT GAGTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGT

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
19568 VL	187	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGG GCCACTGGCATCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG CGTAGCAACTGGCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATCAAG
20185 VH	196	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCCGCCTGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGT GGTGGTAGCACATACAACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATTTTGGGTCTTACTACTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT
20185 VL	197	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG GCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGTCCAATAATAAG AACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAATCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCAT TACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATT CAGTGGCAGCGGG TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCA GTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTGGTCCACCGACGTTCCGGCCAAGGGACC AAGGTGGAAATCAA
20300 VH	206	CAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCATCCTGGGGGGTCCCTA AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTTGACACCTATGCCATGACCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGCGGTAGT GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGA GACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGAC ACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGATAGTGGGAGTTACCCACTTTGACTACTGG GGCCAGGGCACCTGGTCACGGTCTCGAGT
20300 VL	207	GAAATTGTGATGACGAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG GCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGTCCAACAATAAG AACTATTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCAT TACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATT CAGTGGCAGCGGG TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCA GTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTGGTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACA CGACTGGAGATTAAAG
20362 VH	216	CAGGTCACCTTGAAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTACAGACCCTG TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTCATTACTGG AGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTCT TACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTTCGACTTACCATATCA GTAGACCGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCG GACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACCGGTATTACGATATTTGACTGGTTAC CCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACGGTCTCGAGT
20362 VL	217	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCGACAGG GCCACTGGCATCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG CGTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATCAAG
20621 VH	226	

Ab	SECV ID NR:	Secvență (5' la 3')
		CAGGTGCAGCTACAGCAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTG TCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGG AGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTCT TATAGTGGGAGTATCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCA
		GTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCACG GACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACCGGTATTACGATCTTTTGACTGGTTAC CCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACGGTCTCGAGT
20621 VL	227	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGA GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGG GCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG CGTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACAGACTGGAGATTAAG

Tabelul 13 prezintă secvențele de proteine deduse ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor ale anticorpilor anti-TIM-3 suplimentari identificați ca anticorpi funcționali. CDR-urile sunt arătate cu caractere aldine și italice. Secvențele pentru anticorpii funcționali 20131 și 20293 sunt prezentate în Tabelul 10 de mai sus.

Tabelul 13: Secvențele de proteine ale domeniilor variabile ale anticorpilor anti-TIM-3 funcționali suplimentari

Ab	SECV ID NR:	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
19324 VH	168	QMQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTVSSY AMSWVRQALGKGLEWVSG ISGS GGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKIVGATHFDYW GQGTILVTVSS
19324 VL	169	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPLLI Y WAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYISGPITTF GQGT RLEIK
19416 VH	178	QVQLVESGPGGLVKPSQTLSTCTVS GGSSINSGGY WSWIRQHPGKGLEWIGY IY YSGSI YYNPISLRSLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CATPYYYGSGSY GDYW GQGTILVTVSS
19416 VL	179	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVNNY LAWYQQKPGQAPRLLIY DASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYY CQQRSNWPI TFGQGTREIK
19568 VH	188	QMQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS GGSISSVGY YWNWIRQHPGKGLEFIGY IY YSGSI YYNPISLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTALYY CASVGIVGASYF EYW GQGTILVTVSS
19568 VL	189	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY DASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYY CQQRSNWPI TFGQGTREIK
20185 VH	198	QVQLVESGGGLVLRPGGSLRLSCAVS GFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSG ISGS GGST YNADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKIFGSYFDYW GQGTILVTVSS

Ab	SECV ID NR:	Secvență (capătul N-terminal la capătul C-terminal)
20185 VL	199	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNY LAWYQQKSGQPPKLLI Y WAST TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYY CQQYYSGPPTFG QGT KVEIK
20300 VH	208	QVQLQQSGGGLVHPGGSRLRLSCAAS GFTVDTYAM TWVRQAPGKGLEWVSG ISGS GGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRDEDTAVYY CAKIVGVTHFDYW GQGTLVTVSS
20300 VL	209	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYRSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLI Y WAST TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYY CQQYYSGPITFG QGT RLEIK
20362 VH	218	QVTLKESGPGLVKPSQTLSTCTVS GGSISSGGHY WSWIRQHPGKLEWIGY IS YSGST YYNP SLKSRITISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CATAYYDILTGY PFDYWG QGTLVTVSS
20362 VL	219	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY DASDR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYY CQQRSNWPIITFG QGTREIK
20621 VH	228	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCTVS GGSISSGGYY WSWIRQHPGKLEWIGY IS YSGST YYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTATDTAVYY CATAYYDLLTGY PFDYWG QGTLVTVSS
20621_VL	229	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY DASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYY CQQRSNWPIITFG QGTREIK

Tabelul 14 prezintă CDR-urile anticorpilor anti-TIM-3 funcționali suplimentari. SECV ID NR. pentru CDR-uri sunt arătate sub fiecare secvență. Secvențele CDR au fost determinate în acest document în conformitate cu definițiile IMGT® pentru CDR1 și CDR2. Pentru CDR3 de lanț greu și ușor, definițiile din acest document includ un reziduu de aminoacid suplimentar în amonte de IMGT-CDR3 (Cys) și un reziduu de aminoacid suplimentar în aval (Trp pentru CDR3 din VH, Phe pentru CDR3 din VL). Secvențele pentru anticorpii funcționali 20131 și 20293 sunt prezentate în Tabelul 11 de mai sus.

Table 14: Protein sequences of CDRs of additional functional anti-TIM-3 antibodies

Ab	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
19324	GFTVSSYA	ISGSGGST	CAKIVGATHFDYW	QSVLYSSNNKNY	WAS	CQQYYSGPITF
	170	171	172	173	174	175
19416	GGSIINSGGY	IYYSGSI	CATPYYYGSGSYGDY W	QSVNNY	DAS	CQQRSNWPITF
	180	181	182	183	184	185
19568	GGSISSVGY	IYYSGSI	CASVGIVGASYFEYW	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPITF
	190	191	192	193	194	195
20185	GFTFSSYA	ISGSGGST	CAKIFGSYYFDYW	QSVLYSSNNKNY	WAS	CQQYYSGPPTF
	200	201	202	203	204	205
20300	GFTVDTYA	ISGSGGST	CAKIVGVTHFDYW	QSVLYRSNNKNY	WAS	CQQYYSGPITF
	210	211	212	213	214	215
20362	GGSISSGGHY	ISYSGST	CATAYYDILTGYPFD YW	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPITF
	220	221	222	223	224	225
20621	GGSISSGGY	ISYSGSI	CATAYYDLLTGYPFD YW	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPITF
	230	231	232	233	234	235

Exemplul 2: Analiza de legare cinetică a anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 și 15086.17144

Acest exemplu demonstrează că afinitatea de legare a anticorpilor 15086.15086 (IgG1), 15086.16837 (IgG1 LALA), 15086.17145 (IgG2), și 15086.17144 (IgG4 (S228P)) a arătat afinități de legare foarte similare cu valori K_D în jur de 19-23 nM. "IgG1 LALA" se referă la prezența mutațiilor "LALA" în lanțul greu (L234A/L235A, numerotate în conformitate cu schema de numerotare EU (Edelman și colab., Proc. Natl. Acad. USA, 63: 78-85 (1969)), care sunt cunoscute pentru faptul că reduc funcția efectoră a regiunii Fc a anticorpilor IgG1 (Armor și colab., Eur J Immunol., 29 (8):2613-24 (1999); Hezareh și colab., J Virol., 75 (24): 12161-68 (2001); și Hessel și colab., Nature, 449 (7158): 101-104 (2007)).

Materiale și metode

Analiza de legare cinetică a fost efectuată prin rezonanța plasmonului de suprafață (SPR), folosind un microspotter cu flux continuu (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, SUA) combinat cu un instrument Ibis MX96 SPR (IBIS Technologies, Olanda). Analiza prin imagistică a rezonanței plasmonului de suprafață a fost efectuată pe senzori SPR G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, Olanda). Anticorpilor anti-TIM-3 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144 au fost diluați la 0,15 μ g/ml în PBS-T (1x PBS cu 0,05% Tween 20, pH 7,4). Anticorpilor au fost depuși pe un G-a-hu-IgG Fc SensEye® timp de 15 minute folosind un microspotter cu flux continuu. După depunere, SensEye® a fost poziționat în biosenzorul IBIS MX96, iar analiza cinetică a fost efectuată prin aplicarea așa-numitei serii de titrare cinetică (Karlsson și colab., Anal Biochem., 349 (1): 136-47 (2006)), în care antigenul ECD al TIM-3 uman monomeric (Acro Biosystems) a fost injectat în concentrații crescătoare de la 2 nM la 100 nM fără aplicarea etapelor de regenerare a suprafeței după fiecare injecție de antigen. Asocierea antigenului a fost efectuată timp de 5 minute și disocierea antigenului a fost efectuată timp de 45 de minute. Răspunsurile de legare înregistrate au fost adaptate la un model de legare Langmuir 1:1 simplu cu software-ul Scrubber 2 pentru calcularea constantelor on-rate (k_{on} sau k_a), off-rate (k_{off} sau k_d) și de afinitate (K_D).

Rezultate

Măsurătorile cinetice efectuate pe sistemul IBIS au arătat că anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144, în patru formate diferite de izotip, au avut, toți, cinetici de legare foarte similare cu valori K_D în intervalul 19-23 nM (Tabelul 15).

Tabelul 15: Cineticele de legare ale anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.1714 la ECD al TIM-3 uman așa cum sunt măsurate prin rezonanța plasmonului de suprafață (SPR)

Format/ Subclasă	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	Eroare k_{on}	k_{off} (s ⁻¹)	Eroare k_{off}	K_D (nM)	Eroare K_D
15086. 15086	5,06E+05	± 6.E+02	1,17E-02	± 8.E-06	23	± 3,0E-11
15086. 16837	5,83E+05	± 4.E+02	1,11E-02	± 4.E-06	19	± 1,0E-11
15086. 17145	5,56E+05	± 4.E+02	1,03E-02	± 4.E-06	19	± 1,0E-11

Format/ Subclasă	kon (M-1 s-1)		Eroare kon	koff (s-1)		Eroare koff	KD (nM)		Eroare KD
15086.17144	4,96E+05	±	3.E+02	9,85E-03	±	4.E-06	20	±	2,0E-11

Exemplul 3: Evaluarea funcțională *in vitro* a anticorpului anti-TIM-3

Un panou de mAb unici din subclasa IgG1 a fost clonat așa cum s-a descris mai sus (Exemplul 1) și evaluat pentru activitate funcțională la o singură concentrație (25 ug/ml) în analiza de reacție limfocitară mixtă unidirecțională (MLR). Anticorpul anti-TIM-3 cel mai funcțional (15086.15086) a fost reformatat în subclasele IgG1 LALA (15086.16837), IgG2 (15086.17145) și IgG4 (15086.17144).

Acest exemplu demonstrează activitatea funcțională *in vitro* a diferitelor sub-clase IgG ale anticorpului anti-TIM-3 prin inducerea secreției de citokine dependentă de doză într-o analiză MLR unidirecțională.

Materiale și metode

În analiza MLR unidirecțională, celulele dendritice (DC) și celulele T CD4+ pozitive (CD4+) izolate de la doi donatori sănătoși diferiți sunt co-cultivate pentru a induce o reacție specifică aloantigenului, rezultând producția de citokine și activarea/proliferarea celulelor T. Celulele dendritice au fost diferențiate de monocitele CD14+ prin 6 zile de cultură cu 20 ng/ml de factor de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage (GM-CSF) și 20 ng/ml de interleukină-4 (IL-4) și amestecate într-un raport de 1:10 cu celule T CD4+ izolate din celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC-uri) din material donator sănătos. După 5 zile de cultură, supernatanții au fost recoltați, și nivelurile de IFN- γ și TNF- α au fost determinate utilizând analiza de citokină de electrochimiluminiscență pe Scala Meso. Această analiză folosește etichete electrochimiluminiscente (SULFO-TAG) care sunt conjugate cu anticorpi de detecție. Atunci când electrozilor de placă se aplică curent, este emisă lumină de eticheta SULFO-TAG, iar intensitatea luminii este măsurată pentru a cuantifica citokinele din probe.

Rezultate

Curbele doză-răspuns în analiza MLR unidirecțională a anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144 sunt prezentate în Figurile 1 și 2. Curbele doză-răspuns au fost generate printr-o titrare de două ori a anticorpilor cu o concentrație de pornire de 50 ug/ml. Fiecare punct din grafic reprezintă media a trei replicare, barele de eroare reprezentând SEM.

Anticorpul 15086.15086 și 15086.17145 (variante IgG1 și IgG2) au prezentat o funcționalitate similară și au indus o creștere dependentă de doză atât a IFN- γ cât și a TNF- α în analiza MLR unidirecțională. Anticorpul 15086.17144 (variantă IgG4) a indus un răspuns numai la cele două concentrații cele mai mari, în timp ce nu a fost observată nicio funcționalitate a anticorpului 15086.16837 (variantă IgG1 LALA).

Exemplul 4: Efectul anticorpului anti-TIM-3 asupra subseturilor de celule purificate

Despre TIM-3 s-a raportat mai întâi că este exprimat selectiv de celulele T helper CD4+ producătoare de IFN- γ și celulele citotoxice T CD8+ (CD8+ pozitive), și s-a demonstrat că este un regulator negativ al răspunsului celulelor T. Ulterior, s-a descoperit că TIM-3 este foarte exprimat în mod endogen pe celulele dendritice, monocite și celulele natural killer (NK) (Freeman și colab., Immunol Rev, 235: 172-89 (2010); Kuchroo și colab., Nat Rev Immunol, 8: 577-580 (2008); Anderson și colab., Science, 318: 1141-1143 (2007); și Da Silva și colab., Cancer Immunol Res, 2: 410-422 (2014)). Acest exemplu arată modul în care ligarea TIM-3 de către anticorpi anti-TIM-3 are un efect direct asupra celulelor dendritice, conducând la o creștere a secreției de TNF- α .

Materiale și metode

PBMC, celule T CD4+ naive și celule CD8+ naive au fost izolate din material donator sănătos. Au fost generate celule dendritice de la trei donatori individuali sănătoși, așa cum s-a descris anterior în Exemplul 3. Subseturile de celule izolate au fost incubate timp de 5 zile cu 10 ug/ml din anticorpii indicați, și nivelurile de TNF- α au fost determinate utilizând analiza de citokină de electrochimiluminiscență pe Scala Meso.

Rezultate

Efectul direct asupra subseturilor de celule purificate al anticorpilor 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, și 15086.17144 este afișat în Figura 3, unde fiecare bară reprezintă media a cinci replicare și barele de eroare reprezintă SEM. Rezultatele demonstrează că prezența variantei IgG1 (15086.15086) sau IgG2 (15086.17145) a anticorpului anti-TIM-3 a avut ca rezultat o creștere a secreției de TNF- α din celulele dendritice de la toți cei trei donatori. Un efect similar a fost observat în populația PBMC care conține mai multe subseturi de celule care exprimă TIM-3 (de ex., monocite și celule NK). Variantele IgG1 LALA (15086.16837) și IgG4 (15086.17144) au avut doar un efect minim asupra secreției de TNF- α . Niciunul dintre anticorpii testați nu a avut efect asupra celulelor T CD4+ naive sau a celulelor T CD8+ naive.

Exemplul 5: Analiza citometrică în flux a anticorpilor anti-TIM-3 pentru activitatea de blocare a fosfatidilserinei

Acest exemplu ilustrează modul în care un anticorp anti-TIM-3 din invenție [15086.17145] a fost testat pentru activitatea de blocare a fosfatidilserinei (PtdS) prin efectuarea unei analize de competiție citometrică în flux utilizând celule apoptotice pozitive la fosfatidilserină de suprafață și TIM-3 solubil marcat cu fluorocrom.

Materiale și metode

Activitatea de blocare a fosfatidilserinei a fost investigată într-o analiză pe bază de celule, în care celule T Jurkat sunt induse să sufere apoptoză prin tratament cu Staurosporină (din *Streptomyces* sp., Sigma-Aldrich, SUA). În timpul apoptozei, PtdS este translocată de pe fața citoplasmatică a membranei plasmatice la suprafața celulei și permite ca legarea proteinei chimerice TIM-3-Fc umane marcate cu R-PE să fie analizată prin citometrie în flux. Proteina chimerică TIM-3-Fc recombinantă disponibilă în comerț (R&D Systems, SUA) a fost conjugată la R-PE utilizând kitul de conjugare cu R-Ficoeritrină Lightning-Link® (Innova Biosciences, Marea Britanie). Pentru fiecare concentrație de anticorp care urmează să fie testată, 25 μ l de diluție de TIM-3-PE (corespunzând la aproximativ 0,33 μ g de TIM-3-Fc) au fost amestecați cu 25 μ l de anticorp (începând la 20 μ g/ml final) în tampon de legare Anexin V (BD Pharmingen™, SUA) și se incubează la temperatura camerei (RT) timp de 20 de minute înainte de adăugarea la celule. Celulele T Jurkat au fost cultivate în prezența a 1 μ M de Staurosporină timp de 2 ore, spălate o dată în tampon de legare la RT, și pentru fiecare test, 2×10^5 celule în 50 μ l de tampon de legare au fost combinate cu amestecul anticorp/TIM-3-PE. După 15 minute de incubare la RT, s-au adăugat 100 μ l de tampon de legare, celulele au fost centrifugate cu reducerea vitezei de rotire, și peleții au fost re-suspendați în 100 μ l de tampon de legare pentru achiziție. Legarea TIM-3-PE la celulele apoptotice a fost cuantificată prin citometrie în flux care detectează fluorescența PE (MFI). În paralel, expunerea la suprafață a PtdS pe celulele tratate cu Staurosporină a fost confirmată prin colorare cu Anexin V-PE (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen™). Anticorpul anti-PD-1 Keytruda® (pembrolizumab; Merck & Co., Inc.) a fost utilizat drept control negativ pentru legarea TIM-3/blocarea PtdS, și un anticorp de referință anti-TIM-3 ABTIM3 [18571.18571] (WO 2015/117002 A1; Novartis AG) a fost utilizat ca un control pozitiv pentru legarea TIM-3/blocarea PtdS. În plus, un anticorp anti-TIM-3 diferit [15338.15338], care a fost identificat anterior ca un anticorp neblokant, a fost utilizat, de asemenea, drept control negativ pentru blocarea PtdS.

Rezultate

Rezultatele experimentului de competiție sunt prezentate în Figura 4. Anticorpul anti-TIM-3 [15086.17145] este capabil să inhibe interacțiunea TIM-3-Fc solubil cu PtdS afișată în celule într-o manieră dependentă de doză (Figura 4A). La 3,125 μ g/ml, el blochează legarea TIM-3-Fc la celulele PtdS- pozitive până la 2% din legarea detectată în prezența unui anticorp anti-TIM-3 neblokant [15338.15338] (Figura 4B). Anticorpul anti-TIM-3 de referință [18571.18571] a fost capabil să blocheze legarea până la 3,2% la aceeași concentrație (Figura 4C). Rezultatele pentru anticorpul anti-PD-1 de control negativ Keytruda® sunt prezentate în Figura 4D.

Exemplul 6: Clonarea analogilor de anticorpi de referință anti-TIM-3

Analogi de referință ai anticorpilor anti-TIM-3 ABTIM3 și mAb15 sunt utilizați în mai multe dintre exemplele din acest document. Analogii de referință au fost generați așa cum este descris mai jos.

Secvențele de aminoacizi ale domeniului variabil al lanțului greu și ușor ale ABTIM3 și mAb15 au fost obținute din cererile de brevet de invenție prezentate în Tabelul 16 de mai jos. Secvențele de aminoacizi ale fragmentelor de lanț greu variabil (VH) și lanț ușor variabil (VL) au fost translatate invers în secvențe ADN cu utilizarea codonului uman. Fragmentele de ADN corespunzătoare au fost apoi sintetizate și clonate în vectori de exprimare care conțin regiuni constante ale lanțului greu uman constant (oricare dintre cele patru formate de izotip diferite: IgG1, IgG1-LALA, IgG2, sau IgG4) sau regiuni constante ale lanțului ușor kappa uman, rezultând secvențele de lanț greu și ușor ale anticorpului de lungime întreagă. Pentru a preveni schimbul de braț Fab în varianta IgG₄, reziduul de serină de la poziția 228 (numerotare EU) a fost substituit cu prolină (Angal și colab., Mol. Immunol., 30: 105-108 (1993)). Celule CHO au fost transfectate cu plasmidele de exprimare rezultate folosind un sistem standard de exprimare a proteinelor. După exprimarea anticorpilor, supernatanții de anticorpi corespunzători au fost purificați utilizând cromatografia pe coloană de purificare a proteinei A standard.

Tabelul 16: Analogi de anticorpi sintetizați de gene și formatul de anticorp corespunzător

Anticorp	Numele analogului	Documentul de brevet de referință	Numerale de secvență în documentul de brevet de referință	Diferite de izotip uman produse
ABTIM3	18564 ABTIM3	WO 2015 117002 (A1)	SECV ID NR: 1 (VH) și 2 (VL)	IgG1, IgG1-LALA, IgG2,

Anticorp	Numele analogului	Documentul de brevet de referință	Numerale de secvență în documentul de brevet de referință	Diferite de izotip uman produse
				și IgG4
18571,18571	ABTIM3 umanizat	WO 2015 117002 (A1)	SECV ID NR: 131 (VH) și 132 (VL)	IgG1, IgG1-LALA, IgG2, și IgG4
mAb15	21563 mAb15	WO 2016 111947 (A2)	SECV ID NR: 12 (VH) și 14 (VL)	IgG1, IgG1-LALA, IgG2, și IgG4

Exemplul 7: Evaluarea funcțională *in vitro* a anticorpilor anti-TIM-3 suplimentari într-o analiză MLR unidirecțională

Acest exemplu demonstrează activitatea funcțională *in vitro* a nouă anticorpi anti-TIM-3 suplimentari prin inducerea secreției de IFN- γ dependente de doză într-o analiză de reacție limfocitară mixtă (MLR) unidirecțională.

Materiale și metode

Analiza MLR unidirecțională a fost configurată așa cum este descris mai sus în Exemplul 3. Pe scurt, celulele dendritice (DC) și celulele T CD4⁺ au fost co-cultivate timp de 5 zile în prezența anticorpilor indicați. După 5 zile de cultură, supernatanții au fost recoltați și nivelurile de IFN- γ au fost determinate utilizând analiza IFN- γ de electrochimiluminiscentă pe Scala Meso.

Rezultate

Curbele doză-răspuns pentru cei nouă anticorpi anti-TIM-3 suplimentari sunt arătate în Figura 5. Toți cei nouă anticorpi au indus o creștere dependentă de doză a nivelurilor de IFN- γ în această analiză. De notat, nu a fost observat niciun efect al anticorpilor de referință ABTIM3 și mAb15. Curbele doză-răspuns au fost generate printr-o titrare de două ori a anticorpilor cu o concentrație de pornire de 100 μ g/ml. Fiecare punct din grafic reprezintă media a trei replicare, iar barele de eroare reprezintă SEM.

Exemplul 8: Evaluarea funcțională *in vitro* a anticorpilor anti-TIM-3 suplimentari într-o analiză MLR bidirecțională

Acest exemplu demonstrează activitatea funcțională *in vitro* a zece anticorpi anti-TIM-3 suplimentari prin inducerea secreției de IFN- γ dependente de doză într-o analiză de reacție limfocitară mixtă (MLR) bidirecțională.

Materiale și metode

În analiza MLR bidirecțională, celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) de la doi donori sănătoși diferiți au fost co-cultivate pentru a induce o reacție specifică aloantigenului, care a avut ca rezultat producerea de citokine și activarea/proliferarea celulelor T. PBMC-urile de la cei doi donori diferiți au fost amestecate într-un raport de 1:1. După 5 zile de cultură, supernatanții au fost recoltați și nivelurile de IFN- γ au fost determinate utilizând analiza de citokină de electrochimiluminiscentă pe Scala Meso.

Rezultate

Curbele doză-răspuns pentru cei zece anticorpi anti-TIM-3 sunt arătate în Figura 6 pentru o pereche de donori. Toți anticorpii anti-TIM-3 au indus o creștere dependentă de doză a nivelurilor de IFN- γ în această analiză. De notat, nu a fost observat niciun efect al anticorpilor de referință ABTIM3 și mAb15. Curbele doză-răspuns au fost generate printr-o titrare de două ori a anticorpilor cu o concentrație de pornire de 100 μ g/ml. Fiecare punct din grafic reprezintă media a trei replicare, iar barele de eroare reprezintă SEM.

Exemplul 9: Evaluarea funcțională *in vitro* a anticorpilor anti-TIM-3 suplimentari într-o analiză a celulelor dendritice

Acest exemplu demonstrează activitatea funcțională *in vitro* a nouă anticorpi anti-TIM-3 prin inducerea secreției de TNF- α dependente de doză din celule dendritice derivate de monocite.

Materiale și metode

Monocite CD14⁺ au fost izolate din celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC-uri) din material donator sănătos. Celulele dendritice (DC) au fost diferențiate de monocitele CD14⁺ prin 6 zile de cultură cu 20 ng/ml de factor de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage (GM-CSF) și 20 ng/ml de interleukină-4 (IL-4). Celulele dendritice derivate din monocite au fost recoltate și cultivate timp de 5 zile în prezența anticorpilor indicați. După 5 zile de cultură, supernatanții au fost recoltați și nivelurile de TNF- α au fost determinate utilizând analiza TNF- α de electrochimiluminiscentă pe Scala Meso.

Rezultate

Curbele doză-răspuns pentru cei nouă anticorpi anti-TIM-3 suplimentari sunt arătate în Figura 7. Toți cei nouă anticorpi anti-TIM-3 au indus o creștere dependentă de doză a nivelurilor de TNF- α din celulele dendritice derivate din monocite în doi donori independenți. De notat, nu a fost observat niciun efect al anticorpilor de referință ABTIM3 și mAb15. Curbele doză-răspuns au fost generate printr-o titrare de două ori a anticorpilor cu o concentrație de pornire de 100 μ g/ml. Fiecare punct din grafic reprezintă media a trei replicare, iar barele de eroare reprezintă SEM.

Exemplul 10: Măsurarea afinităților anticorpilor pentru TIM-3 uman și de cynomolgus

Acest exemplu demonstrează afinitățile de legare ale fragmentelor Fab de anti-TIM-3 pentru domeniile extracelulare TIM-3 umane și de cynomolgus, măsurate prin rezonanța plasmonului de suprafață (SPR).

Materiale și metode

Analiza de legare cinetică a fost efectuată prin rezonanța plasmonului de suprafață (SPR), folosind un microspotter cu flux continuu (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, SUA) combinat cu un instrument SPR IBIS MX96 (IBIS Technologies, Olanda).

Fragmentele Fab anti-TIM-3 au fost generate din variantele de secvență corectate ale anticorpilor selectați în format IgG1 LALA utilizând kituri de scindare enzimatică standard (Genovis, Suedia). Fragmentele Fab sunt etichetate ca Fab [număr de anticorpi]. Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului greu utilizată pentru Fab 15086 este secvența corectată arătată în SECV ID NR: 7. ADN-ul de TIM-3 care codifică domeniul extracelular al TIM-3 uman și de cynomolgus a fost sintetizat și clonat într-un vector care conține un promotor CMV și o secvență IgG1 Fc umană (AA P101-K330), rezultând fuziunea C-terminală a IgG1 Fc la ECD clonat al TIM-3. Constructele de fuziune TIM-3 Fc au fost generate prin PCR standard și tehnici de proiectare prin inginerie și proteina a fost exprimată tranzitoriu în 2 ml de cultură folosind un sistem de exprimare ExpiCHO™. Constructele de fuziune TIM-3 Fc umane au fost recoltate după 9 zile și supernatanții au fost testați pentru afinitatea de legare la fragmentele Fab anti-TIM-3 prin SPR. Antigenii au fost purificați folosind proceduri standard și capturați pe un G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, Olanda) timp de 15 minute folosind un micro-spotter cu flux continuu (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, SUA). După depunere, SensEye® a fost poziționat în biosenzorul IBIS MX96, situsurile de captură rămase au fost blocate, și proteinele capturate au fost fixate la suprafață folosind kitul FixIT (Ssens BV, Olanda). Analiza cinetică a fost efectuată prin aplicarea așa-numitei serii de titrare cinetică (Karlsson R., 2006), în care fragmentele Fab monomerice ale anticorpilor din invenție au fost injectate în concentrații crescătoare de la 1 nM la 100 nM fără aplicarea etapelor de regenerare a suprafeței după fiecare injecție de Fab. Asocierea Fab a fost efectuată timp de 15 minute și disocierea antigenului a fost efectuată timp de 15 de minute. Răspunsurile de legare înregistrate au fost adaptate la un model de legare Langmuir 1:1 simplu cu software-ul Scrubber 2 pentru calcularea constantelor on-rate (kon sau ka), off-rate (koff sau kd) și de afinitate (KD).

Rezultate

Rezultatele măsurătorii de afinitate demonstrează că Fab 15086, Fab 20293 și Fab 20131 și cei doi anticorpi de referință leagă TIM-3 uman și de cynomolgus cu afinități diferite. Cineticile de legare detaliate sunt prezentate în Tabelul 17 de mai jos.

Tabelul 17: Cineticile de legare ale fragmentelor Fab anti-TIM-3 la ECD al TIM-3 uman sau de cynomolgus, așa cum sunt măsurate prin SPR.

Fragment Fab	TIM-3 ECD	kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	koff (s ⁻¹)	KD (nM)
15086	uman	2,3E+05	5,0E-03	22
15086	de cynomolgus	1,3E+04	2,8E-02	2200
20293	uman	2,9E+05	3,6E-03	13
20293	de cynomolgus	1,7E+06	3,5E-03	21
20131	uman	7,6E+04	4,1E-04	5,5
20131	de cynomolgus	4,8E+06	3,9E-04	22
18564 ABTIM3	uman	2,7E+05	2,1E-04	0,77
18564 ABTIM3	de cynomolgus	1,5E+05	3,9E-03	25
21563 mAb15	uman	7,9E+05	6,3E-04	0,80
21563 mAb15	de cynomolgus	ND	ND	ND
*ND: Nu a fost determinat				

Exemplul 11: Determinarea ELISA a legării anticorpului la ECD al TIM-3 uman și de cynomolgus

Acest exemplu demonstrează aviditățile de legare ale anticorpilor anti-TIM-3 pentru ECD al TIM-3 uman și de cynomolgus, așa cum sunt măsurate prin ELISA.

Materiale și metode

Legarea anticorp-antigen a fost măsurată prin ELISA cu antigeni de fuziune TIM-3 Fc acoperiți la 1 µg/ml. Antigenii umani și de cynomolgus au fost obținuți de la Sino Biologicals. Anticorpul anti-TIM-3 au fost incubati cu antigenii acoperiți la diferite concentrații începând de la 150 µg/ml (1000 nM) în titrări în serie de două ori. După spălare, anticorpii legați au fost detectați prin anticorpi secundari conjugați cu HRP (peroxidază de hrean).

Rezultate

ELISA a demonstrat că toți anticorpulii evaluați sunt capabili să se lege atât de ECD al TIM-3 uman, cât și de cynomolgus. Este raportată concentrația anticorpilor anti-TIM-3 care produce jumătate din legarea maximă (EC50). Toți anticorpulii testați au legat TIM-3 uman cu valori EC50 în jur de 1 nM sau mai mici, în timp ce s-a observat variație mult mai mare în legarea la TIM-3 de cynomolgus (Tabelul 18). Unii anticorpi, cum ar fi 20131, 20185, 20293 și ABTIM3, au arătat legare identică atât la TIM-3 uman, cât și de cynomolgus. Alți anticorpi, cum ar fi 19324, 19416, 19568, și 20300, au arătat legare intermediară la TIM-3 de cynomolgus, în timp ce anticorpul 20362, 20621 și 15086.17145 au arătat reactivitate încrucișată slabă la TIM-3 de cynomolgus (reducere a EC50 mai mare de 100 de ori). Curbele de legare pentru anticorpul care au prezentat cea mai scăzută reactivitate încrucișată la TIM-3 de cynomolgus au arătat în mod clar legarea saturată la antigen atunci când au fost testați la cea mai mare concentrație în evaluarea ELISA.

Tabelul 18: Aviditățile de legare (EC50) ale anticorpilor anti-TIM-3 la TIM-3 uman sau de cynomolgus așa cum sunt măsurate prin ELISA

Anticorp	EC50 (nM)		Raport EC50 cynomolgus/uman
	TIM-3 uman	TIM-3 de cynomolgus	
19324	0,73	18,38	25
19416	0,20	9,42	47
19568	0,38	30,20	79
20131	0,13	0,13	1
20185	0,17	0,15	1
20293	0,31	0,32	1
20300	1,13	45,30	40
20362	0,26	124,80	481
20621	0,22	29,70	135
15086,17145	0,125	17,50	134
18564 ABTIM3	0,07	0,07	1

Exemplul 12: Binning-ul de epitopi al anticorpilor anti-TIM-3

Acest exemplu ilustrează modul în care anticorpul anti-TIM-3 din invenție pot fi grupați în bin-uri de epitopi pe baza șabloanelor de competiție împerecheate. Anticorpul care aparțin diferitelor bin-uri de epitopi recunosc diferiți epitopi în domeniul extracelular (ECD) al TIM-3.

Materiale și metode

Investigarea competiției de anticorpi împerecheate a fost efectuată prin analiza de rezonanță a plasmonului de suprafață (SPR) folosind un microspotter cu flux continuu (CFM) (Wasatch Microfluidics, SUA) combinat cu un instrument SPR IBIS MX96 (IBIS Technologies, Olanda). Analiza de imagistică prin rezonanță a plasmonului de suprafață a fost efectuată pe un senzor SPR G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, Olanda). Un total de șaisprezece anticorpi anti-TIM-3 IgG2 umani și doi anticorpi de referință IgG4 (ABTIM3 și mAb15) au fost diluați la 15 µg/ml în tampon PBS care conține 0,05% Tween 20 (PBS-T), pH 7,0. Anticorpul au fost capturați pe suprafața senzorului anti-Fc prin depunere timp de 15 minute folosind un microspotter cu flux continuu. După depunere, SensEye® a fost poziționat în biosenzorul IBIS MX96 și situsurile anti-Fc reziduale au fost blocate prin injectarea a 30 µg/ml de IgG1 umană non-specifică. Anticorpul capturați au fost conjugați la suprafața folosind un kit FixIt (Ssens BV, Olanda). După prepararea senzorului, analiza competiției anticorpilor a fost efectuată folosind o analiză sandwich clasică în care anticorpul imobilizați s-au legat de 200 nM de antigen TIM-3 monovalent solubil (Acro Biosystems, China), urmată de sondarea pentru legarea cu un alt anticorp anti-TIM-3. Apoi, au fost efectuate injecții individuale ale fiecăruia dintre cei optsprezece anticorpi anti-TIM-3 diluați

la 15 µg/ml în tampon PBS-T pentru a stabili șabloane de competiție de anticorpi. După fiecare ciclu de competiție, suprafața senzorului a fost regenerată cu 100 mM de tampon H₃PO₄, pH 3,0.

Rezultate

Șablonul de competiție al optsprezece anticorpi anti-TIM-3 este prezentat în Figura 8. Anticorpii mAb15 (bin 1), 15105 și 15107 (bin 2), 15260 și ABTIM3 (bin 3), 17244 (bin 7), și 15174 și 15175 (bin 8) nu au prezentat activitate funcțională în analizele MLR pe bază de celule descrise în acest document, dar au fost incluși deoarece ei au recunoscut epitopi distincți. Anticorpii din bin-ul 8 au fost testați doar în soluție, deoarece legarea TIM-3 a fost redusă în mod semnificativ atunci când acești anticorpi au fost capturați pe suprafața senzorului (blocare unidirecțională). Prin urmare, acești anticorpi sunt reprezentați prin pătrate. S-a descoperit că anticorpii anti-TIM-3 funcționali se leagă la trei bin-uri de epitopi (bin-urile 4, 5 și 6) care concurează încrucișat. Anticorpii funcționali care aparțin bin-ului de epitopi 4 au inclus anticorpii 20621, 20293, 19568, 20362, 15086.17145, și 19416. Acești anticorpi s-au încrucișat unul pe altul și anticorpii din bin-urile de epitopi 3, 5, 6 și 7. Anticorpii funcționali care aparțin bin-ului de epitopi 5 au inclus anticorpii 20131 și 20185. Acești anticorpi s-au încrucișat unul pe altul și anticorpii din bin-urile de epitopi 3, 4, 6 și 7. În plus, 20131 și 20185 au împiedicat, de asemenea, legarea mAb15 atunci când au fost capturați doar pe suprafața senzorului (blocare unidirecțională, linii întrerupte). În cele din urmă, anticorpii funcționali care aparțin bin-ului de epitopi 6 au inclus anticorpii 19324 și 20300. Acești anticorpi s-au încrucișat unul pe altul și toți ceilalți anticorpi, cu excepția anticorpilor din bin-ul 2.

Din rezultatele prezentate mai sus se poate deduce că anticorpii funcționali din bin-urile de epitopi 4, 5 și 6 sunt epitopi de legare care sunt distincți de anticorpii de referință ABTIM3 (bin 3) și mAb15 (bin 1) (Figura 1), deoarece fiecare grup de binning are șabloane de competiție unice în comparație cu ceilalți anticorpi anti-TIM-3 din panou.

Exemplul 13: Maparea epitopilor anticorpilor anti-TIM-3 prin mutageneza TIM-3

Epitopii de anticorpi pot fi caracterizați în general ca epitopi liniari (numiți, de asemenea, epitopi continui) sau epitopi conformaționali (numiți, de asemenea, epitopi discontinui). În timp ce epitopii liniari sunt definiți pe baza unei singure secvențe de aminoacizi continue, epitopii conformaționali pot consta din multe secvențe liniare discontinue mai mici sau reziduuri de contact unic. O colecție de reziduuri de contact care se grupează la interfața proteinei intermoleculare dintre anticorp și antigen este denumită, de asemenea, un punct fierbinte (Moreira și colab., *Proteins*, 68 (4): 803-12 (2007)). Acum este recunoscut pe scară largă faptul că majoritatea epitopilor de celule B sunt discontinui în natură (Sivalingam și Shepherd, *Mol Immunol.*, 51 (3-4): 304-9 (2012)), Kringelum și colab., *Mol Immunol.*, 53 (1-2): 24-34 (2013)) cu epitopul mediu care se întinde pe 15-22 de reziduuri de aminoacizi dintre care 2-5 aminoacizi contribuie la cea mai mare parte a legării (Sivalingam și Shepherd, *supra*).

Prin clasificarea afinității de legare la 129 de mutații TIM-3 diferiți, acest exemplu ilustrează modul în care epitopii de legare ai Fab 15086, Fab 20293, și Fab 20131 pot fi împărțiți în epitopi liniari și puncte fierbinți care sunt distincte de epitopii recunoscuți de anticorpii de referință ABTIM3 și mAb15.

Materiale și metode

Receptorul TIM-3 uman constă dintr-un domeniu extracelular (ECD) de 181 de aminoacizi (reziduurile 22-202) urmat de un domeniu transmembranar (reziduurile 203-223) și un domeniu citoplasmic (reziduurile 224-301). TIM-3 aparține super familiei de imunoglobuline și ECD este compus din două domenii - un domeniu de mucină și un domeniu IgV. Domeniul IgV conține un sandwich de două niveluri β, format din interacțiunile a 7 catene β antiparalele dispuse în două foi β cu catenele β GFCC' pe o parte și catenele β BED pe partea opusă. Cele două foi β sunt stabilizate printr-o legătură de disulfură între reziduurile C54 - C123. O structură cristalină este disponibilă pentru IgV TIM-3 uman (PDB 5F71). Domeniul IgV TIM-3 nu are o catenă A ca alte domenii IgV, dar posedă două legături de disulfură suplimentare (C58-C63 și C52-C110) care poziționează buclele CC' și FG în imediata apropiere, formând o despătură unică pentru legarea ligandului fosfatidilserină (PS). Există o structură cristalină a TIM-3 murin în complex cu ligandul PS (3KAA), demonstrând contacte de legare a ligandului la buclele CC' și FG.

Au fost identificați mai mulți liganzi și/sau co-receptori pentru TIM-3, inclusiv HMGB-1, galectina-9, CEACAM-1, și fosfatidilserina (Chiba și colab., *Nat. Immunology*, 13 (9): 832-42 (2012), Li și colab., *Hepatology*, 56 (4):1342-51 (2012), DeKruyff și colab., *J Immunology*, 184 (4): 1918-30 (2010), Das și colab., *Immunol Rev.*, 276 (1): 97-111 (2017)).

Secvențele de proteine de TIM-3 uman și ortologi au fost descărcate de la UniProt; uman (Q8TDQ0; SECV ID NR: 236), maimuță cynomolgus (*Macaca fascicularis*, G7P6Q7; SECV ID NR: 237), șoarece (*Mus musculus*, Q8VIM0; SECV ID NR: 238) și șobolan (*Rattus norvegicus*, P0C0K5; SECV ID NR: 239). Aceste secvențe sunt arătate în Tabelul 23. Identitatea de secvență dintre diferitele secvențe extracelulare de aminoacizi TIM-3 este arătată în Tabelul 19 de mai jos.

Tabelul 19: Diferențele de aminoacizi dintre, și identitatea de secvență față de domeniul extracelular TIM-3 uman.

	Diferențe de aminoacizi	% Identitate de secvență
ECD al TIM-3 de cynomolgus	22	85,3
ECD al TIM-3 de șobolan	54	64,0
ECD al TIM-3 de șoarece	59	60,7

Din structurile cristaline și secvențele de aminoacizi au fost identificate reziduurile de aminoacizi expuse la suprafață și 82 de substituții individuale de alanină au fost proiectate în ECD al TIM-3 uman (scanare de alanină).

Pentru a mapa epitopii liniari în contextul structurii TIM-3 nativ uman, au fost generate 47 de proteine chimerice în care 10 aminoacizi din secvența ECD al TIM-3 uman au fost schimbați secvențial la secvența de șoarece în segmente care s-au suprapus prin 5 aminoacizi, și s-au suplimentat cu versiuni de șobolan și cynomolgus în bucle critice. Schimburile de secvențe au fost efectuate în domeniul extracelular al TIM-3 uman din care fac parte aminoacizii 22-199.

ADNc care codifică domeniul extracelular al TIM-3 uman a fost sintetizat și clonat într-un vector care conține promotorul CMV și secvența IgG1 Fc umană (AA P101 -K330), rezultând fuziunea C-terminală a IgG1 Fc la ECD al TIM-3 clonat. Constructele de fuziune de TIM-3 Fc umane mutate au fost generate prin PCR standard și tehnici de proiectare prin inginerie și proteina a fost exprimată tranzitoriu în 2 ml de cultură folosind un sistem de exprimare ExpiCHO™. Constructele de fuziune TIM-3 Fc umane au fost recoltate, purificate și testate pentru afinitatea de legare la fragmentele Fab anti-TIM-3 prin rezonanța plasmonului de suprafață (SPR). Proteinele de fuziune TIM-3 au fost imobilizate pe un pe un G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, Olanda) timp de 15 minute folosind un microspotter cu flux continuu (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, SUA). După depunere, SensEye® a fost poziționat în biosenzorul IBIS MX96 și proteinele capturate au fost fixate la suprafață folosind kitul FixIT (Ssens BV, Olanda). Analiza cinetică a fost efectuată prin aplicarea așa-numitei serii de titrare cinetică (Karlsson R., 2006), în care fragmentele Fab monomerice ale anticorpilor din invenție au fost injectate în concentrații crescătoare de la 1 nM la 100 nM fără aplicarea etapelor de regenerare a suprafeței după fiecare injecție de Fab. Asocierea Fab a fost efectuată timp de 15 minute și disocierea antigenului a fost efectuată timp de 15 de minute. Răspunsurile de legare înregistrate au fost adaptate la un model de legare Langmuir 1:1 simplu cu software-ul Scrubber 2 pentru calcularea constantelor on-rate (kon sau ka), off-rate (koff sau kd) și de afinitate (KD).

Rezultate

Afinitățile de legare ale Fab-urilor anti-TIM-3 15086, 20293, 20131 și a analogilor de referință ABTIM3 și mAb15 au fost evaluate în raport cu legarea modificată la constructele mutante TIM-3.

Afinitățile de legare ale fragmentelor Fab pentru constructele TIM-3 care au suferit mutație au fost exprimate ca raport între KD de mutant/KD de tip sălbatic (afinitate de legare normalizată). Tabelele 20 și 21 arată proteinele chimerice și mutanții de alanină care au dat rezultate de diferențiere. O reducere a afinității de cel puțin 5 ori a fost folosită ca un criteriu de prag pentru detectarea afinității de legare reduse la constructele TIM-3 mutante. În unele cazuri nu a putut fi detectată nicio legare la Fab-urile specifice. Aceste constructe au fost enumerate ca NB (nu se leagă).

Analiza a arătat că epitopii de legare ai Fab-urilor anti-TIM-3 15086, 20293 și 20131 au fost în mod clar distincți în comparație cu anticorpii de referință ABTIM3 și mAb15. 15086 și 20293 nu s-au legat la proteina chimerică cu secvența de șoarece inserată la pozițiile 62-67, aproape de buclele de legare de ligand CC' și FG, în timp ce ABTIM3 de referință s-a legat (Tabelul 20). Epitopul lui 15086 de pe TIM-3 s-a extins dincolo de această întindere de aminoacizi care include P50, V60, F61, E62, G64, R69 și reziduurile de buclă FG I117, M118, D120 așa cum se evidențiază prin scanare de alanină (Tabelul 21). Fab 20293 a avut un epitop foarte asemănător cu 15086, cu excepția faptului că reziduurile M118 și D120 au afectat numai legarea la 15086 atunci când au suferit mutație la alanină. S-a descoperit că Fab 20131 se leagă la un epitop diferit prezent în bucla FG la reziduurile 114-117, iar acest lucru a fost extins prin scanare de alanină pentru a include reziduurile 118, 120 și, de asemenea, reziduurile CC' F61 și E62. Comună pentru 15086, 20293, și 20131 a fost sensibilitatea pentru o mutație de alanină la poziția F61, la care niciunul dintre cei doi anticorpi de referință nu a prezentat sensibilitate. Cu toate că anticorpusul de referință mAb15 nu s-a legat de secvența mutantă la pozițiile 62-67, analog cu 15086 și 20293, epitopul mAb15 a fost în mod clar distinct deoarece acest anticorp nu s-a legat de două constructe suplimentare în care secvența din pozițiile 74-85 a fost schimbată la șoarece. Anticorpusul ABTIM3 a prezentat în mod clar un epitop diferit definit de constructele liniare care au suferit mutație la pozițiile 22-28, 107-144 și 123-128, așa cum este evidențiat prin afinitatea de legare modificată la aceste proteine (Tabelul 20). Un rezumat al constatărilor de mapare a epitopilor este arătat în Tabelul 22 de mai jos și un model molecular al modului în care epitopii se mapează pe suprafața domeniului TIM-3 IgV este prezentat în Figura 9.

În rezumat, am demonstrat la un nivel molecular, prin analizarea legării la un panou de 129 de mutanți TIM-3, faptul că cele trei Fab-uri 15086, 20293, și 20131 recunosc epitopi unici, dar parțial suprapuși, în partea de sus a domeniului TIM-3 IgV. Această constatare este în concordanță cu analiza de binning de epitopi (Exemplul 12) care arată că toți cei trei anticorpi se leagă la epitopii care concurează încrucișat care se suprapun, care împreună constituie o suprafață funcțională pe domeniul TIM-3 IgV. Acești epitopi se suprapun în mod clar cu situsul de legare de fosfatidilserină, precum și aminoacidul E62, care este esențial pentru legarea HMGB-1 și CEACAM1 (Chiba și colab., Nat. Immunology, 13 (9): 832-42 (2012), Das și colab., Immunol Rev., 276 (1): 97-111 (2017)), în timp ce cei doi anticorpi de referință au epitopi situați mai mult în partea de mijloc a domeniului IgV (mAb15) și pe cealaltă parte a domeniului IgV (ABTIM3). Rezultatele sunt în concordanță cu datele de binning de epitopi, care arată că mAb15 și ABTIM3 se pot lega la TIM-3 simultan (Exemplul 12). Pe baza locației de epitop a 15086, 20293, și 20131, se antipează că fiecare anticorp este capabil să blocheze legarea liganzilor TIM3 (fosfatidilserina, CEACAM-1 și HMGB-1).

Tabelul 20: Rezumatul analizei afinității de legare pentru fragmente Fab care se leagă la construite de ECD de TIM-3 cu segmente de secvență de șoarece, șobolan sau cynomolgus inserate. Legarea normalizată este exprimată drept KD de mutant / KD de tip sălbatic.

# construct chimERIC	Regiunea scanată huTIM-3	Regiunea care a suferit mutație huTIM-3	Mutații introduse din alte specii	15086	20293	20131	18564 (ABTIM3)	mAb15
1	22-31	AA 22-28	S22I; V24N; E25S; R27N; A28F	1.0	1.4	1.0	5.4	ND
2	62-71	AA 62-67	E62Q; G64T; V66E; V67L	0.7	1.7	1.7	0.7	■
3	72-81	AA 74-80	D74N; N76T; W78Q; T79K; T9S80	0.6	1.3	1.0	1.9	■
4	77-85	AA 78-85	W78Q; T79K; T9S80; W83Q; N85K	1.0	1.4	1.0	2.0	■
5	81-90	AA 83-89	W83Q; N85K; D87N; R89Y	3.0	0.7	2.7	1.7	15.3
6	106-115	AA 107-114	I107T; I114F	0.6	0.6	2.0	17.5	1.2
7	111-120	AA 114-117	I114F; I117L	0.7	3.1	8.4	1.1	2.2
8	121-130	AA 123-128	F123H; L125V; L27V128	0.9	1.2	1.1	31.0	0.8
		modificare a KD < 5 ori a mutantilor chimERICi						
		modificare a KD > 5 ori a mutantilor chimERICi						
		Nicio legare a mutantilor chimERICi						

ND nu a fost determinat

Tabelul 21: Rezumatul analizei afinității de legare pentru anticorpul Fab care se leagă la mutații ECD de TIM-3 umani scanate cu alanină. Legarea normalizată este exprimată drept KD de mutant / KD de tip sălbatic.

Mutație	15086	20293	20131	18564 (ABTIM3)	mAb15
P50A	82,7	4,9	53,5	4,2	308,8
V60A	11,3	1,7	1,0	1,6	1,4
F61A	■	■	■	1,0	0,9
E62A	38,0	3,7	6,5	4,4	4,0
G64A	18,5	2,0	0,9	2,1	1,7
R69A	■	■	0,7	■	■
I114A	1,3	0,8	4,8	1,5	1,3
I117A	75,2	9,3	■	0,9	1,2
M118A	14,4	0,4	■	0,9	1,0
D120A	7,1	2,1	23,3	6,5	4,4
E121A	1,1	0,8	2,5	10,6	1,3
■ modificare a KD < 5 ori a mutațiilor de alanină					
■ modificare a KD > 5 ori a mutațiilor de alanină					
■ Nicio legare a mutațiilor de alanină					

Tabelul 22: Rezumatul epitopilor de legare identificați pentru anticorpul anti-TIM-3 testați

Anticorp	Blocare ligandului (PS)	a Bin epitopi de	Epitop liniar	Reziduurile de contact
15086	Da	4	62 - 67	P50, V60, F61, E62, G64, R69 1117, M118, D120
20293	Da	4	62 - 67	F61, R69 1117
20131	Da	5	114 - 117	P50, F61, E62, I117, M118, D120
18564 (ABTIM3)	ND	3	22 - 28 107 - 114 123 - 128	R69, D120, E121
21563 (mAb15)	ND	1	62 - 67 74 - 80, 78 - 85 83 - 89	P50, R69

Tabelul 23: Secvențe de proteine TIM-3

Proteină	Secvența de aminoacizi
TIM-3 uman	MFSLHPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPV FECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNKGFHKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMND EKFNKLVIKPAKVTAPTRQRDFTAAFFRMLTTGRHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLA NELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSL SLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAM P
UniProt Q8TDQ0 (SECV NR: 236)	
TIM-3 de cynomolgus	MFSLHPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYIAEVGQNAYLPCSYTPAAPGNLVPVCWGKGACPV FDCSNVVLRTDNRDVNDRTSGRYWLKGFHKGDVSLTIENVTLADSGVYCCRIQIPGIMN DEKHNVLKLVVIKPAKVTAPTLQRDLTSAPFRMLTTGEHGPAETQTPGSLPDVNLTVSNF FCELQIFTLTNELRDSGATIRTAIYIAAGISAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSL ISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIEDVVEVEEPNEYCYVSSGQQPSQPLGCRVA MP
UniProt G7P6Q7 (SECV NR: 237)	
TIM-3 de șoarece	
UniProt	

Proteină	Secvența de aminoacizi
Q8VIM0 SECV ID NR: 238	MFSGLTLNCLVLLQLLLARSLENAYVFEVGKNAYLPCSYTLSTPGALVPMCWGKGFCPW SQCTNELLRTDERNVYQKSSRYQLKGDNLKGDVSLIIKNVTLDDHGTCCRIQFPGLMN DKKLELKLDIKAAKVTPAQTAHGDSSTASPRTLTTERNGSETQTLVTLHNNGTKISTWA DEIKDSGETIRTAIHIGVGSAGLTLALIIIGVLILKWYSSKKKKLSSLSLITLANLPFGG LANAGAVRIRSEENIYTIENVEVENSNEYCYVNSQQPS
TIM-3 de șobolan	MFSWLPFSCALLLQPLPARSLNAYTAEVGKNAYLPCSYTVPAAGTLVPICWGKGSCPL LQCASVVLRTDETNTYRKSRRYQLKGNFYKGDMSLTIKNVTLADSGTYCCRIQFPGLMN DEKLELKL SITEPAKVI PAGTAHGDSSTASPRTLTTEGSGSETQTLVTLHDNNGTKISTW ADEIKDSGETIRTAVHIGVGSAGLALALIIIGVLILKWYSSKKKKLQDLSLITLANSPFG GLVNAGAGRIRSEENIYTIENIYEMENSNEYCYVSSQQPS
UniProt POCOK5 SECV ID NR: 239	

Tabelul 24: Secvențe de anticorpi anti-TIM-3

Ab	ADN		Proteină		H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3	L- CDR1	L- CDR2	L- CDR3
	VH	VL	VH	VL						
15086,15086	1	2	3	4	7	8	9	10	11	12
15086,16837/ 15086,17145/ 15086,17144	13	14	15							
20131	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
20293	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
15105	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
15107	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
15109	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
15174	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
15175	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
15260	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
15284	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115
15299	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
15353	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
15354	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145
17244	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155
17245	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
19324	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
19416	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185
19568	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
20185	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205
20300	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215
20362	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
20621	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235

Tabelul 25: Regiunea constantă și secvențele TIM-3

SECV ID NR.	Secvență
5	Secvență de proteină de regiune constantă a lanțului greu IgG1
6	Secvență de proteină de regiune constantă a lanțului ușor Kappa IgG1
16	Secvență de ADN de regiune constantă a lanțului greu IgG1-LALO excluzând intronii
17	Secvență de ADN de regiune constantă a lanțului greu IgG1-LALO incluzând

SECV ID NR.	Secvență
	intronii
18	Secvență de ADN de regiune constantă a lanțului greu IgG4 (S228P) excluzând intronii
19	Secvență de ADN de regiune constantă a lanțului greu IgG4 (S228P) incluzând intronii
20	Secvență de ADN de regiune constantă a lanțului greu IgG2 excluzând intronii
21	Secvență de ADN de regiune constantă a lanțului greu IgG2 incluzând intronii
22	Secvență de ADN de regiune constantă a lanțului ușor Kappa
23	Secvență de proteină de regiune constantă a lanțului greu IgG1-LALA
24	Secvență de proteină de regiune constantă a lanțului greu IgG4 (S228P)
25	Secvență de proteină de regiune constantă a lanțului greu IgG2
236	TIM-3 uman
237	TIM-3 de cynomolgus
238	TIM-3 de șoarece
239	TIM-3 de șobolan

LISTA DE SECVENȚE

- 5 <110> SYMPHOGEN A/S
 <120> ANTICORPI ANTI-TIM-3 ȘI COMPOZIȚII
 <130> SPG17972PCT
 <140>
 <141>
- 10 <150> 62/321,476
 <151> 2016-04-12
 <160> 240
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
- 15 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
- 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 1
 cagggtgcagc tacagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ttggacccgt 120
 cagcaccacag ggatgggcct ggagtggatt ggatacatct cttacagtgg gagtatctat 180
 tacactccgt ccctcaagag tcgacttacc atatcagtgg acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tatattactg tgcgagtttg 300
 gattcctggg gatctaaccg tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 2
 <211> 321
- 25 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
- 30 <400> 2

	gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagattaa g	321
	<210> 3	
5	<211> 120	
	<212> PRT	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
10	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
	<400> 3	
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
	1 5 10 15	
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly	
	20 25 30	
	Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Thr Arg Gln His Pro Gly Met Gly Leu Glu	
	35 40 45	
	Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Thr Pro Ser	
	50 55 60	
	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
	65 70 75 80	
	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
	85 90 95	
	Cys Ala Ser Leu Asp Ser Trp Gly Ser Asn Arg Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 4	
	<211> 107	
15	<212> PRT	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
20	<400> 4	
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
	20 25 30	

70

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

10

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 6

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 7

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr

10 1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 8

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ile

20 1 5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

25 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 9

Cys Ala Ser Leu Asp Ser Trp Gly Ser Asn Arg Asp Tyr Trp

30 1 5 10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 10

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 11
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 11
Asp Ala Ser
1
 10 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 12
Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr Phe
1 5 10
 <210> 13
 20 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 13
cagggtgcagc tgcaggagag tggccccgga ctgggtcaagc cttcacagac tctgagcctg 60
acctgcacag tgtctggcgg aagtatcagc tccggggggtt actattggag ctggaccoga 120
cagcaccacag gaatgggtct ggaatggatc gggtacattt catatagcgg ctccatctac 180
tatacacccct cactgaaaag caggetgacc atttccgtgg acacatctaa gaaccagttc 240
agcctgaaac tgtctagtgt gacagccgct gatactgcag tctactattg tgcctccctg 300
gactcttggg gcagtaatag agattactgg ggccagggaa ctctgggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 14
 <211> 321
 30 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 35 <400> 14
gagatcgtgc tgactcagtc cccagccacc ctgtcactga gccagggaga acgagcaacc 60
ctgtcttgca gggcctccca gtctgtcagc tccctacctg cttgggtatca gcagaagccc 120
gggcaggcac ctcgactgct gatctacgac gccagtaaca gagctaccgg tattcccgcc 180
cgcttcagtg gttcaggcag cggaacagac tttaccctga caatctctag tctggagcct 240
gaagatttcg ccgtgtacta ttgtcagcag aggtctaatt ggccactgac atttggcgga 300
gggactaagg tcgagatcaa g 321
 <210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 40 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Thr Arg Gln His Pro Gly Met Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Thr Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Leu Asp Ser Trp Gly Ser Asn Arg Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 16

<211> 990

<212> ADN

<213> Secvență Artificială

<220>

10

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 16

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120

tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cactgaagc cgccggggga 360

ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaaag cgcgaggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660

aaagccaaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 720

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840

ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacacg 960

15

cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990

<210> 17
 <211> 1596
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 17
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
 tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag 300
 aggccagcac agggaggagg ggtgtctgct ggaagccagg ctgagcgctc ctgcctggac 360
 gcatcccggc tatgcagtcc cagtccaggg cagcaaggca ggccccgtct gcctcttcac 420
 ccggaggcct ctgccccccc cactcatgct caggagagg gtcttctggc tttttcccca 480
 ggctctgggc aggcacaggc taggtgcccc taaccaggc cctgcacaca aaggggcagg 540
 tgctgggctc agacctgcca agagccatat ccgggaggac cctgccccctg acctaagccc 600
 accccaaagg ccaaactctc cactccctca gctcggacac cttctctcct ccagattcc 660
 agtaactccc aatcttctct ctgcagagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc 720
 accgtgcccc ggtaagccag ccaggccctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 780
 tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 840
 ctctctcagc acctgaagcc gccgggggac cgtcagttct cctcttcccc caaaaacca 900
 aggacaccct catgatctcc cggaccctgt aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc 960
 acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca 1020
 agacaaagcc gggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctccaccg 1080
 tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc 1140
 tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccctg ggggtgcgag 1200
 ggccacatgg acagaggccg gctcggccca ccctctgccc tgagagtgc cgctgtacca 1260
 acctctgtcc ctacagggca gcccagagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1320
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1380
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1440
 10 cccgtgtgg actccgacgg ctcttctc ctctatagca agtcaccgt ggacaagagc 1500
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtct gcacaaccac 1560
 tacacgcaga agagcctct cctgtcccc ggtaaa 1596
 <210> 18
 <211> 981
 15 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 20 <400> 18

gcttccacca agggcccatc ggttttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc	360
ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat	480
ggcgtggagg tgcataaatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac	540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaa	600
tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag	720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc	840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggctc accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg	900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc	960
ctctccctgt ctctgggtaa a	981

<210> 19
 <211> 1588
 <212> ADN
 5 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 19

gcttccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caogaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag	300
agggcagcac agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagccctc ctgcctggac	360
gcaccccggc tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca ggccccatct gtctcctcac	420
ccggaggcct ctgaccaccc cactcatgct cagggagagg gtcttctgga tttttccacc	480
aggctccggg cagccacagg ctggatgccc ctacccagg ccctgagcat acaggggag	540
gtgctgcgct cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccctgcccct gacctaaacc	600
caccccaaag gccaaactct ccactccctc agctcagaca ccttctctcc tcccagatct	660
gagtaactcc caatcttctc tctgcagagt ccaaatatgg tccccatgc ccacatgcc	720
caggtaagcc aaccagggc tcgccctcca gctcaaggcg ggacagggtgc cctagagtag	780
cctgcatcca gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcat ccacctccat ctcttctca	840
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaacc caaggacact	900
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac	960
cccgaggctc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	1020
ccgccccagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	1080
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgctc	1140
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc acggggtgcg agggccacat	1200
ggacagaggt cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt	1260
ccctacaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat	1320
gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc	1380
cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct	1440
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcagggtgca	1500
ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca	1560
gaagagcctc tcctgtctc tgggtaaa	1588

<210> 20

<211> 978

<212> ADN

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 20

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgctg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
aaatgttgtg tcgagtgcc accgtgccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc	480
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	540
gtggtcagcg tcctcacctg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg	660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	720
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg	780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac	840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	960
tcctgtctc cgggtaaa	978

<210> 21

<211> 1585

<212> ADN

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 21

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgctg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttggtgag	300
agggcagctc agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagccctc ctgcctggac	360

10

	gcaccccggc tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca ggccccatct gtctcctcac	420
	ccggaggcct ctgcccgccc cactcatgct cagggagagg gtcttctggc tttttccacc	480
	aggctccagg caggcacagg ctgggtgccc ctaccccagg cccttcacac acaggggcag	540
	gtgcttggct cagacctgcc aaaagccata tccgggagga ccctgcccct gacctaaccc	600
	gaccccaaaag gccaaactgt ccactccctc agctcggaca ccttctctcc tcccagatcc	660
	gagtaactcc caatcttctc tctgcagagc gcaaagtgtg tgtcgagtgc ccaccgtgcc	720
	caggtaagcc agcccaggcc tcgccctcca gctcaaggcg ggacagggtgc cctagagtag	780
	cctgcatcca gggacaggcc ccagctgggt gctgacacgt ccacctccat ctcttccctca	840
	gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc	900
	atgatctccc ggacccttga ggtcacgtgc gtgggtgggg acgtgagcca cgaagacccc	960
	gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca	1020
	cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt gtggtcagcg tcctcacctg tgtgcaccag	1080
	gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct ccagaccccc	1140
	atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggc gggaccgcg gggatatgagg gccacatgga	1200
	cagaggccgg ctcgccccc cctctgccct gggagtgacc gctgtgcaa cctctgtccc	1260
	tacagggcag ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatcccgga aggagatgac	1320
	caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt	1380
	ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccattgctga	1440
	ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg gacaagagca ggtggcagca	1500
	ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa	1560
	gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa	1585
	<210> 22	
	<211> 321	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 22	
	cgtacgggtg ctgcaccatc tgtcttcttc ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct	60
	ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120
	tggaggtggt ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	180
	agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag	240
10	aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag	300
	agcttcaaca ggggagagtg t	321
	<210> 23	
	<211> 330	
15	<212> PRT	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
20	<400> 23	

MD/EP 3443009 T2 2022.02.28

80

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55						60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105						110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 24

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 25

5 <211> 326

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 25

MD/EP 3443009 T2 2022.02.28

83

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105						110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 26

<211> 354

<212> ADN

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 26

caggtgcagc tacagcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttaagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagt ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatacaac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa caogctgttt 240

ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaattttt 300

10 gggtcctact actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcacagtctc gagt 354

<210> 27

<211> 339

<212> ADN

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 27

gaaattgtga tgacacagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactggac atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctaaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggtga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtgg 300
 cctccgacgt tccggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339
 <210> 28
 <211> 118
 <212> PRT
 5 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 28
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Lys Ile Phe Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 10 115
 <210> 29
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 15 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 29

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 30

Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr Ala

10 1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 31

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

20 1 5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

25 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 32

Cys Ala Lys Ile Phe Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 33

30 <211> 12

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 33

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 3
 <212> PRT
 5 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 34
 Trp Thr Ser
 10 1
 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 15 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 35
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Pro Pro Thr Phe
 1 5 10
 20 <210> 36
 <211> 377
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 25 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 36
 acgtgacagg ggcgcgccag gtccagctgc aggagagcgg tcccgactg gtgaagccat 60
 cccagacact gagcctgact tgtactgtga gcggcggtag catctccagc ggccgctact 120
 attggctctg gatcaggcag caccagga agggcctgga gtggatcggc tacatctact 180
 atagcggctc tatctactat aacccttccc tgaagagcgg ggtgaccatc tctgtggaca 240
 catccaagaa tcagttctat ctgaagctgt cttccgtgac cgcgctgat acagccgtgt 300
 actattgcgc ctactgatg gtctgggggg tcatgggcga ttactggggg cagggcacac 360
 tggtcacagt ctcgagt 377
 <210> 37
 30 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 37
 gagattgtgc tgaccagtc tcccgccacc ctgtctctga gtcctggcga gagagccacc 60
 ctgagctgca gagcctctca gtccgtgtcc agctatctgg cctggatatca gcagaagccc 120
 ggccaggctc cccggtgct gatctacgat gcctccaata gagccaccgg catccctgcc 180
 agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttaccctga ccatctccag cctggaacct 240
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cggtcgact ggcctctac atttggccaa 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa g 321
 <210> 38
 <211> 120
 40 <212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Leu Met Val Trp Gly Val Met Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 39

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 5 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 40
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr
 1 5 10
 <210> 41
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 41
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile
 1 5
 <210> 42
 <211> 14
 20 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 25 <400> 42
 Cys Ala Ser Leu Met Val Trp Gly Val Met Gly Asp Tyr Trp
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 43
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 35 <210> 44
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 40 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 44
 Asp Ala Ser
 1
 45 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 50 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 45
 Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Thr Phe
 1 5 10
 <210> 46
 55 <211> 345
 <212> ADN

<213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 5 <400> 46
 cagggtcacct tgaaggagtg gggcgagga ctgttgaggc cctcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggttg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccagggaagg ggctggagtg gataggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacgga ccaagaaaca attctccctg 240
 aagctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag atattgggag 300
 ctccctgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cgagt 345
 <210> 47
 10 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 47
 gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caactatta ctgtctacag cataatagtt accctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa g 321
 <210> 48
 <211> 115
 20 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 25 <400> 48
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Trp Gly Ala Gly Leu Leu Arg Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ala Thr Lys Lys Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Tyr Trp Glu Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser
115

<210> 49

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

10 <400> 49

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 50

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 51

Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
1 5

30 <210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

35 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 52
 Cys Ala Arg Tyr Trp Glu Leu Pro Asp Tyr Trp
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 53
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5
 <210> 54
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 54
 Ala Ala Ser
 20 1
 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 55
 Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe
 1 5 10
 30 <210> 56
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 56
 cagatgcagc tgggtgcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gggtactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatgtca gttgacacgt ccaagcacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag atggtgggag 300
 cttcctgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cgagt 345
 <210> 57
 40 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 57

gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa g 321
 <210> 58
 <211> 115
 <212> PRT
 5 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 58
 Gln Met Gln Leu Val Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys His Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Trp Trp Glu Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 10 115
 <210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 59

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

- 5 <210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Secvență Artificială
<220>
<221> sursă
10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 60
Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5
<210> 61
<211> 7
15 <212> PRT
<213> Secvență Artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
20 <400> 61
Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
1 5
<210> 62
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Secvență Artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 62
Cys Ala Arg Trp Trp Glu Leu Pro Asp Tyr Trp
30 1 5 10
<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> Secvență Artificială
35 <220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 63
Gln Gly Ile Arg Asn Asp
1 5
40 <210> 64

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 5 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 64
Ala Ala Ser
1
 <210> 65
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 65
Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr Phe
1 5 10
 <210> 66
 <211> 351
 20 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 25 <400> 66
 cagatgcagc tgggtgcaatg gggcgagga ctgttgaagc ctcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gggtactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtgcagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag gttttactat 300
 gctccgaact ttgactactg gggccagggc accctggtca ccgtctcgag t 351
 <210> 67
 <211> 318
 <212> ADN
 30 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 67
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggacagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attccacttt cggcggaggg 300
 35 **accaaggtgg agatcaaa** 318
 <210> 68
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 40 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 68

Gln Met Gln Leu Val Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Phe Tyr Tyr Ala Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 69

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 70
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5
 <210> 71
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 71
 Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 72
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 72
 Cys Ala Arg Phe Tyr Tyr Ala Pro Asn Phe Asp Tyr Trp
 20 1 5 10
 <210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 73
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5
 30 <210> 74
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 74
 Lys Ala Ser
 1
 40 <210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 75
 Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Thr Phe
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 360
 50 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 55 <400> 76

	caggtgcagc tgcagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
	acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtaatt actactgggg ctggatccgc	120
	cagccccag ggaaggggct ggagtggtt gggagtatct attatagtgg gaacacctac	180
	tacaacctgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc	240
	tcctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacag	300
	acagtggctg gccccctctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcgagt	360
	<210> 77	
	<211> 321	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 77	
	gaaattgtga tgacgcagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca	120
	gggaaagccc ctaaggtcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ctactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attcattcac tttcggccct	300
10	gggaccaaag tggatatcaa g	321
	<210> 78	
	<211> 120	
	<212> PRT	
	<213> Secvență Artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
	<400> 78	
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
	1 5 10 15	
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser	
	20 25 30	
	Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
	35 40 45	
	Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser	
	50 55 60	
	Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
	65 70 75 80	
	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
	85 90 95	
	Cys Ala Arg Gln Thr Val Ala Gly Pro Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
20	<210> 79	
	<211> 107	

<212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 79
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Leu Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105
 10 <210> 80
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 80
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Asn Tyr Tyr
 1 5 10
 <210> 81
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 81
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 82
 <211> 14
 30 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 35 <400> 82
 Cys Ala Arg Gln Thr Val Ala Gly Pro Leu Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10
 <210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Secvență Artificială
 <220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 83
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5
 5 <210> 84
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 84
 Lys Ala Ser
 1
 <210> 85
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 85
 Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Phe Thr Phe
 1 5 10
 <210> 86
 <211> 375
 25 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 30 <400> 86
 cagggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctgctggata caccttaacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gccttgagtg gatgggacgg atcaacccta acagtgggtg ctcaacaat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggg 300
 cccctgtata gcagtggctg gtacgagggt gcttttgata tctggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct cgagt 375
 35 <210> 87
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 40 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 87
 gaaattgtga tgacgcagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agttggttg cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccacag tataatagtt attctccggg gtcactttc 300
 ggcgaggga ccaaggtgga gatcaag 327

<210> 88
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 88
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30

 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Asn Asn Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Glu Gly Pro Leu Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Glu Gly Ala Phe
 10 100 105 110

 Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 89
 <211> 109
 <212> PRT
 15 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 89

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Pro
85 90 95

Gly Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 90

Gly Tyr Thr Leu Thr Gly Tyr Tyr

10 1 5

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 91

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser

20 1 5

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

25 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 92

Cys Ala Arg Glu Gly Pro Leu Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Glu Gly Ala
1 5 10 15

Phe Asp Ile Trp
20

<210> 93

30 <211> 6

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 93
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5
 <210> 94
 <211> 3
 5 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 94
 Lys Ala Ser
 1
 <210> 95
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 95
 Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Pro Gly Leu Thr Phe
 20 1 5 10
 <210> 96
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 96
 cagatgcagc tacagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
 acctgtgccca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
 cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
 tctgcttttg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
 cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
 agagagggtg gcagtggctg gtacggatac gtccaccact ggggccaggg caccctggtc 360
 accgtctcga gt 372
 30 <210> 97
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 97
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagcttcc ctgtctgtat ctctgggaga aactgtcacc 60
 atcgaatgtc gagcaagtga ggacatttac aatggtttag catggtatca gcagaagcca 120
 gggaaatctc ctacagctcct gatctataat gcaaatagct tgcatactgg ggtcccatca 180
 cggttcagtg gcagtggatc tggtagacag tattctctca agataaacag cctgcaatct 240
 gaagatgtcg caagttatct ctgtcaacag tattacgatt atcctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321
 40 <210> 98
 <211> 124
 <212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

5 <400> 98

Gln Met Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Ser Ala Phe Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Tyr Val His
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 99

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

15

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 100

<211> 10

<212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 100
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala
 1 5 10
 <210> 101
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 101
 Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Ser
 1 5
 <210> 102
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 102
 Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Tyr Val His His Trp
 25 1 5 10 15
 <210> 103
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 103
 Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
 1 5
 35 <210> 104
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 40 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 104
 Asn Ala Asn
 1
 <210> 105
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 105
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Pro Thr Phe
 1 5 10
 <210> 106
 <211> 369
 55 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 106
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctcccttcagc agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 120
 5 cagccccctg ggaaggggct ggagtggtt gggatcttct attatagtgg gaccacctac 180
 tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgcac acacgtccaa gagccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagaggg 300
 ggagaatatt ttgaccggtt actcccttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcgagt 369
 <210> 107
 <211> 321
 10 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 15 <400> 107
 gaaattgtga tgacgcagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtcg gggcattagc agttatttag cctggtatca gcaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tggaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag cttaatagtt acccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321
 <210> 108
 <211> 123
 20 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 108
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ile Phe Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 25 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ala His Thr Ser Lys Ser Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Glu Tyr Phe Asp Arg Leu Leu Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 109

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

10

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 110

Gly Gly Ser Phe Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr
1 5 10

20

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

25

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 111

Phe Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr
1 5

30

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 5 <400> 112
 Cys Ala Arg Gly Gly Glu Tyr Phe Asp Arg Leu Leu Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 Trp
 <210> 113
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 113
 Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 15 1 5
 <210> 114
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 20 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 114
 Ala Ala Ser
 1
 25 <210> 115
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 30 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 115
 Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Phe Thr Phe
 1 5 10
 <210> 116
 35 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 40 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 116
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgt gaaagatggg 300
 gcaggaggct ttgactactg gggccaggga accctggcca ccgtctcgag t 351
 <210> 117
 <211> 321
 45 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 117
 gatattgtga tgacgcagtc ttcattctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattata aatcatttag gctgggtatca gcataaacca 120
 gggaaagccc ctaatcgctt aatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 5 gaagattttg caacttatta ctgtctacgg cataatagtt accctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa g 321
 <210> 118
 <211> 117
 <212> PRT
 10 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 118
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Asp Gly Ala Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 15 115
 <210> 119
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 20 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 119
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 25

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ile Asn His
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Arg His Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 120

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

10 1 5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 121

Ile Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr

20 1 5

<210> 122

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

25 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 122

Cys Val Lys Asp Gly Ala Gly Gly Phe Asp Tyr Trp

30 1 5 10

<210> 123

<211> 6

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 123

Gln Gly Ile Ile Asn His

40 1 5

<210> 124

<211> 3

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 124
 Ala Ala Ser
 5 1
 <210> 125
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 125
 Cys Leu Arg His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe
 1 5 10
 15 <210> 126
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 126
 caggtgcagc tacagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtggtaggc actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccacag ggaggggcct ggagtggatt gggtagcatc attacagtgg gagcatctac 180
 tacaacccgt ccctcaagag tcgacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcgc tgtattactg tgcgagttat 300
 tactatgcc a gtagtggtga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360
 tcgagt 366
 <210> 127
 25 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 127
 gaaacgacac tcacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321
 <210> 128
 <211> 122
 35 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 40 <400> 128

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly
20 25 30

Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Tyr Tyr Tyr Ala Ser Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 129

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 129

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 130
 Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly Gly His Tyr
 1 5 10
 5 <210> 131
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 131
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile
 1 5
 <210> 132
 15 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 132
 Cys Ala Ser Tyr Tyr Tyr Ala Ser Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 1 5 10 15
 <210> 133
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 133
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 134
 <211> 3
 <212> PRT
 35 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 134
 Asp Ala Ser
 40 1
 <210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 135
 Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe
 1 5 10
 50 <210> 136
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 55 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

	<400> 136	
	caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc	60
	tcctgtacag cctctggatt cacctttagt aattatgcc aagagctgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtc gtggtggtag cacattcttc	180
	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagag cacgctgtat	240
	ctgcaaacga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggggc	300
	ccgttgtata actggaacga cggatgatgt tttgatatac ggggccaagg gaccacggtc	360
	acagtctcga gt	372
	<210> 137	
	<211> 324	
5	<212> ADN	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
10	<400> 137	
	gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattcacca gggccactgg tatccagcc	180
	aggttcagtg gcactgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
	gaagattttg cactttatta ctgtcagcag tatgataact ggcctccgtg gacgttcggc	300
	caagggacca aggtggaaat caaa	324
	<210> 138	
15	<211> 124	
	<212> PRT	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
20	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
	<400> 138	

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Gly Ser Thr Phe Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Thr Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Pro Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Gly Asp Gly Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 139

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 139

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 140
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
 1 5
 <210> 141
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 141
 Ile Ser Gly Arg Gly Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 142
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 142
 Cys Ala Lys Gly Gly Pro Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Gly Asp Gly Phe
 1 5 10 15
 20 Asp Ile Trp
 <210> 143
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 143
 Gln Ser Val Ser Ser Asn
 1 5
 30 <210> 144
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 144
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 145
 40 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 145
 Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Pro Trp Thr Phe
 1 5 10
 <210> 146
 <211> 357
 50 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

	<400> 146	
	caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgacctggat ccgccaggct	120
	ccaggggaagg ggctggagtg gatttcatac attagtggtg gtggtgggtc catatactac	180
	gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctoactgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgttt atttctgtgc gagagggaac	300
	tggggatcgg cggctcttga tatctggggc caagggacaa tggtcacggc ctcgagt	357
	<210> 147	
	<211> 321	
5	<212> ADN	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
10	<400> 147	
	gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtc gggcattaac aattatttag cctgggtttca gcagaaacca	120
	gggagagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatcg	180
	aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctccaac tctcgccct	300
	gggaccaacg tggatatcaa a	321
	<210> 148	
	<211> 119	
	<212> PRT	
15	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
	<400> 148	
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
20	20 25 30	
	Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
	35 40 45	
	Ser Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
	85 90 95	
	Ala Arg Gly Asn Trp Gly Ser Ala Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
	115	
	<210> 149	

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 5 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 149
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Leu Gly Pro Gly Thr Asn Val Asp Ile Lys
 100 105
 10 <210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 150
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5
 <210> 151
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 25 <400> 151
 Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile
 1 5
 <210> 152
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 152
 Cys Ala Arg Gly Asn Trp Gly Ser Ala Ala Leu Asp Ile Trp
 35 1 5 10
 <210> 153
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 5 <400> 153
 Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 1 5
 <210> 154
 <211> 3
 <212> PRT
 10 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 154
 Ala Ala Ser
 15 1
 <210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 20 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 155
 Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Leu
 1 5 10
 25 <210> 156
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 30 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 156
 cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt caccttttagc agctatgcc aagagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtggta gtggtggtag cgcatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgt gaaagatggg 300
 gcaggaggct ttgactactg gggccagggc accctggcca ccgtctcgag t 351
 35 <210> 157
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 40 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 157
 gacatccagt tgaccagtc cccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatcatttag gctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcc taaatctatgct gcatccagtt tgcaaatggg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa g 321

<210> 158

<211> 117

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

5

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 158

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Lys Asp Gly Ala Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 159

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

15

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 159

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn His
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 160

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

10 1 5

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 161

Ile Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala

20 1 5

<210> 162

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

25 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 162

Cys Val Lys Asp Gly Ala Gly Gly Phe Asp Tyr Trp

30 1 5 10

<210> 163

<211> 6

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 163

Gln Gly Ile Arg Asn His

1 5

<210> 164
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 164
 Ala Ala Ser
 1
 10 <210> 165
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 165
 Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe
 1 5 10
 <210> 166
 20 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 166
 cagatgcagc tacagcagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggggggct cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccgttagc agctatgcc tgcagctgggt ccgccaggct 120
 ctagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaagatagtg 300
 ggagctacc actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcacgggtctc gagt 354
 <210> 167
 <211> 339
 30 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 35 <400> 167
 gaaattgtga tgacacagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtgg 300
 ccgatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaag 339
 <210> 168
 <211> 118
 <212> PRT
 40 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 168

Gln Met Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ile Val Gly Ala Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 169

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

10

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 169

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 170

15

<211> 8

<212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 170
 Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 171
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 171
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 172
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 172
 Cys Ala Lys Ile Val Gly Ala Thr His Phe Asp Tyr Trp
 25 1 5 10
 <210> 173
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 173
 Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10
 35 <210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 174
 Trp Ala Ser
 1
 45 <210> 175
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 175
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Thr Phe
 1 5 10
 <210> 176
 <211> 366
 55 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială

<220>		
<221> sursă		
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"		
<400> 176		
	caggtgcagc tgggtggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc	60
	acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtgggtggtt actactggag ctggatccgc	120
	cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcatctac	180
	tacaaccgct ccctcaggag tcgacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
	tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcgg tttattactg tgogactcct	300
	tattactatg gttcggggag ttatggggac tactggggcc agggcaccct ggtcactgtc	360
5	tcgagt	366
<210> 177		
<211> 321		
<212> ADN		
<213> Secvență Artificială		
10	<220>	
<221> sursă		
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"		
<400> 177		
	gacatccaga tgaccagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttaac aactacttag cctggtacca acagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcccatcac cttcggccaa	300
	gggacacgac tggagattaa a	321
15	<210> 178	
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Secvență Artificială		
<220>		
20	<221> sursă	
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"		
<400> 178		

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Thr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Gly Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 179

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 179

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 180

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 180
 Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr
 1 5 10
 <210> 181
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 181
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile
 1 5
 <210> 182
 15 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 182
 Cys Ala Thr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Gly Asp Tyr Trp
 1 5 10 15
 <210> 183
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 183
 Gln Ser Val Asn Asn Tyr
 1 5
 <210> 184
 <211> 3
 <212> PRT
 35 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 184
 Asp Ala Ser
 40 1
 <210> 185
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 185
 Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe
 1 5 10
 50 <210> 186
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 55 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 186

	cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttctcagac cctgtccctc	60
	acctgcactg tgtctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggaa ctggatccgc	120
	cagcaccagc ggaagggcct ggagttcatt gggtagatct attacagtgg gagcatctac	180
	tacaatccgt ccctcaagag tcgagttacc atatccgtag acacgtctaa gaaccagttc	240
	tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccc tatattactg tgcgagcgtc	300
	ggtatagtgg gagcctccta ctttgagtac tggggccagg gaaccctggc cacagtctcg	360
	agt	363
	<210> 187	
	<211> 321	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 187	
	gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtcg gactgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctatcac cttcggccaa	300
10	gggacacgac tggagatcaa g	321
	<210> 188	
	<211> 121	
	<212> PRT	
	<213> Secvență Artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
	<400> 188	
	Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
20	1 5 10 15	
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Val	
	20 25 30	
	Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
	35 40 45	
	Phe Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser	
	50 55 60	
	Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
	65 70 75 80	
	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr	
	85 90 95	
	Cys Ala Ser Val Gly Ile Val Gly Ala Ser Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly	
	100 105 110	
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	

<210> 189
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 189
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 190
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Val Gly Tyr Tyr
 1 5 10
 20 <210> 191
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 191
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile
 1 5
 30 <210> 192
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 192
 Cys Ala Ser Val Gly Ile Val Gly Ala Ser Tyr Phe Glu Tyr Trp
 1 5 10 15
 <210> 193
 40 <211> 6
 <212> PRT

<213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 5 <400> 193
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 194
 10 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 194
 Asp Ala Ser
 1
 <210> 195
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 25 <400> 195
 Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe
 1 5 10
 <210> 196
 <211> 354
 <212> ADN
 30 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 196
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggttcggc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag tctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatacaac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 cttcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaattttt 300
 35 gggtcctact actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354
 <210> 197
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 40 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 197

gaaattgtga tgacacagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca ataataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaatcagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggtga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtgg 300
 ccaccgacgt tccggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 198

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 198

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ile Phe Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 199

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 199

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 200

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 200

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

10 1 5

<210> 201

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 201

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

20 1 5

<210> 202

<211> 13

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

25 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 202

Cys Ala Lys Ile Phe Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 203

30 <211> 12

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 203

	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser	Ser	Asn	Asn	Lys	Asn	Tyr
	1				5					10		
	<210> 204											
	<211> 3											
	<212> PRT											
5	<213> Secvență Artificială											
	<220>											
	<221> sursă											
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"											
	<400> 204											
	Trp Ala Ser											
10	1											
	<210> 205											
	<211> 11											
	<212> PRT											
	<213> Secvență Artificială											
15	<220>											
	<221> sursă											
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"											
	<400> 205											
	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Pro	Pro	Thr	Phe	
	1				5					10		
20	<210> 206											
	<211> 354											
	<212> ADN											
	<213> Secvență Artificială											
	<220>											
25	<221> sursă											
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"											
	<400> 206											
	cagggtccagc	tacagcagtc	tgaggaggagc	ttggttcac	ctgggggggc	cctaagactc						60
	tcctgtgcag	cctctggatt	caccgttgac	acctatgcc	tgacctgggt	ccgccaggct						120
	ccagggaagg	ggctggagt	ggtctcaggt	attagcggta	gtggtggtag	cacatactac						180
	gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	actccaagaa	cacgctgtat						240
	ctgcaaata	acagcctgag	agacgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gaagatagt						300
	ggagttaccc	actttgacta	ctggggccag	ggcaccctgg	tcacggtctc	gagt						354
30	<210> 207											
	<211> 339											
	<212> ADN											
	<213> Secvență Artificială											
	<220>											
	<221> sursă											
35	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"											
	<400> 207											
	gaaattgtga	tgacgcagtc	tccagactcc	ctggctgtgt	ctctgggcga	gagggccacc						60
	atcaactgca	agtccagcca	gagtgtttta	tacaggtcca	acaataagaa	ctatttagct						120
	tggtaccagc	agaaaccagg	acagcctcct	aagctgtcca	tttactgggc	atctaccggg						180
	gaatccgggg	tcctgaccg	attcagtggc	agcgggtctg	ggacagattt	caactctcacc						240
	atcagcagcc	tgagagctga	agatgtggca	gtttattact	gtcagcaata	ttatagtggg						300
	ccgatcacct	tcggccaagg	gacacgactg	gagattaag								339
	<210> 208											
	<211> 118											
40	<212> PRT											
	<213> Secvență Artificială											
	<220>											

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 208

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Asp Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ile Val Gly Val Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 209

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

10 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 209

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Arg
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

15 Lys

<210> 210

<211> 8

<212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 210
 Gly Phe Thr Val Asp Thr Tyr Ala
 1 5
 <210> 211
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 211
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 212
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 212
 Cys Ala Lys Ile Val Gly Val Thr His Phe Asp Tyr Trp
 25 1 5 10
 <210> 213
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 213
 Gln Ser Val Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10
 35 <210> 214
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 40 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 214
 Trp Ala Ser
 1
 <210> 215
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 215
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Thr Phe
 1 5 10
 <210> 216
 <211> 369
 55 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 216
 cagggtcacct tgaaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtc attactggag ctggatccgc 120
 cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct cttacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccgct ccctcaagag tcgacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcgg tgtattactg tgcgaccgcg 300
 5 tattacgata ttttgactgg ttaccctttt gactactggg gccagggaac cctggtcacg 360
 gtctcgagt 369
 <210> 217
 <211> 321
 10 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 15 <400> 217
 gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccgaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagatcaa g 321
 <210> 218
 <211> 123
 <212> PRT
 20 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 218

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Thr Ala Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 219

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 219

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 220

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 220
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly His Tyr
 1 5 10
 5 <210> 221
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 221
 Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 222
 15 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 222
 Cys Ala Thr Ala Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 Trp
 <210> 223
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 223
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 224
 <211> 3
 <212> PRT
 35 <213> Secvență Artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 224
 Asp Ala Ser
 40 1
 <210> 225
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 225
 Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe
 1 5 10
 50 <210> 226
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secvență Artificială
 <220>

	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 226	
	caggtgcagc tacagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc	60
	acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc	120
	cagcaccagc ggaagggcct ggagtggtt gggtagatct cttatagtgg gagtatctac	180
	tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
	tccctgaagc tgagctctgt gactgccacg gacacggcgg tgtattactg tgcgaccgcg	300
	tattacgata ttttgactgg ttaccctttt gactactggg gccagggaac cctggtcacg	360
	gtctcgagt	369
5	<210> 227	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
10	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 227	
	gaaattgtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa	300
	gggacacgac tggagattaa g	321
	<210> 228	
15	<211> 123	
	<212> PRT	
	<213> Secvență Artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
20	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"	
	<400> 228	

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Thr Ala Tyr Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Tyr Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 229

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 229

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 230

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"


```

<400> 230
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr
1           5           10
<210> 231
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Secvență Artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
10 <400> 231
Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ile
1           5
<210> 232
<211> 17
<212> PRT
15 <213> Secvență Artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 232
Cys Ala Thr Ala Tyr Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Tyr Pro Phe Asp Tyr
20 1           5           10           15

      Trp

<210> 233
<211> 6
25 <212> PRT
<213> Secvență Artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
30 <400> 233
Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1           5
<210> 234
<211> 3
<212> PRT
35 <213> Secvență Artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 234
Asp Ala Ser
40 1
<210> 235
<211> 11
<212> PRT
<213> Secvență Artificială
45 <220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 235
Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe
50 1           5           10
<210> 236
<211> 301
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 236

```

```

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1          5          10          15

Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
          20          25          30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
          35          40          45

Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
          50          55          60

Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
65          70          75          80

Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
          85          90          95

Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
          100          105          110

Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
          115          120          125

Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
          130          135          140

Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145          150          155          160

Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
          165          170          175

Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
          180          185          190

Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
          195          200          205

Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
          210          215          220

Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
225          230          235          240

Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
          245          250          255

Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
          260          265          270

Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
          275          280          285

Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
          290          295          300

```

<210> 237

<211> 302

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

5 <400> 237

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Ile Ala Glu Val Gly Gln
 20 25 30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Ser Tyr Thr Pro Ala Pro Pro Gly Asn Leu
 35 40 45

Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Asp Cys Ser
 50 55 60

Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Asn Arg Asp Val Asn Asp Arg Thr Ser
 65 70 75 80

Gly Arg Tyr Trp Leu Lys Gly Asp Phe His Lys Gly Asp Val Ser Leu
 85 90 95

Thr Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys Arg
 100 105 110

Ile Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys His Asn Val Lys Leu
 115 120 125

Val Val Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Leu Gln Arg
 130 135 140

Asp Leu Thr Ser Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Gly Glu His Gly
 145 150 155 160

Pro Ala Glu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Pro Asp Val Asn Leu Thr
 165 170 175

Val Ser Asn Phe Phe Cys Glu Leu Gln Ile Phe Thr Leu Thr Asn Glu
 180 185 190

Leu Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Thr Ala Ile Tyr Ile Ala Ala
 195 200 205

Gly Ile Ser Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile
210 215 220

Phe Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Thr Gln Asn Leu Ser Leu
225 230 235 240

Ile Ser Leu Ala Asn Ile Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala
245 250 255

Glu Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asp Val
260 265 270

Tyr Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Gly
275 280 285

Gln Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Val Ala Met Pro
290 295 300

<210> 238

<211> 281

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 238

Met Phe Ser Gly Leu Thr Leu Asn Cys Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ala Arg Ser Leu Glu Asn Ala Tyr Val Phe Glu Val Gly Lys
20 25 30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Ser Tyr Thr Leu Ser Thr Pro Gly Ala Leu
35 40 45

Val Pro Met Cys Trp Gly Lys Gly Phe Cys Pro Trp Ser Gln Cys Thr
50 55 60

Asn Glu Leu Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asn Val Thr Tyr Gln Lys Ser
65 70 75 80

Ser Arg Tyr Gln Leu Lys Gly Asp Leu Asn Lys Gly Asp Val Ser Leu
85 90 95

Ile Ile Lys Asn Val Thr Leu Asp Asp His Gly Thr Tyr Cys Cys Arg
100 105 110

Ile Gln Phe Pro Gly Leu Met Asn Asp Lys Lys Leu Glu Leu Lys Leu
115 120 125

Asp Ile Lys Ala Ala Lys Val Thr Pro Ala Gln Thr Ala His Gly Asp
130 135 140

Ser Thr Thr Ala Ser Pro Arg Thr Leu Thr Thr Glu Arg Asn Gly Ser
145 150 155 160

Glu Thr Gln Thr Leu Val Thr Leu His Asn Asn Asn Gly Thr Lys Ile
165 170 175

Ser Thr Trp Ala Asp Glu Ile Lys Asp Ser Gly Glu Thr Ile Arg Thr
180 185 190

Ala Ile His Ile Gly Val Gly Val Ser Ala Gly Leu Thr Leu Ala Leu
195 200 205

Ile Ile Gly Val Leu Ile Leu Lys Trp Tyr Ser Cys Lys Lys Lys Lys
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Ser Leu Ile Thr Leu Ala Asn Leu Pro Pro Gly Gly
225 230 235 240

Leu Ala Asn Ala Gly Ala Val Arg Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr
245 250 255

Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr Glu Val Glu Asn Ser Asn Glu Tyr Tyr
260 265 270

Cys Tyr Val Asn Ser Gln Gln Pro Ser
275 280

<210> 239

<211> 282

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 239

Met Phe Ser Trp Leu Pro Phe Ser Cys Ala Leu Leu Leu Leu Gln Pro
1 5 10 15

Leu Pro Ala Arg Ser Leu Glu Asn Ala Tyr Thr Ala Glu Val Gly Lys
20 25 30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Ser Tyr Thr Val Pro Ala Pro Gly Thr Leu
35 40 45

Val Pro Ile Cys Trp Gly Lys Gly Ser Cys Pro Leu Leu Gln Cys Ala
50 55 60

146

Ser Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Thr Asn Val Thr Tyr Arg Lys Ser
65 70 75 80

Arg Arg Tyr Gln Leu Lys Gly Asn Phe Tyr Lys Gly Asp Met Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Lys Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Thr Tyr Cys Cys Arg
100 105 110

Ile Gln Phe Pro Gly Pro Met Asn Asp Glu Lys Leu Glu Leu Lys Leu
115 120 125

Ser Ile Thr Glu Pro Ala Lys Val Ile Pro Ala Gly Thr Ala His Gly
130 135 140

Asp Ser Thr Thr Ala Ser Pro Arg Thr Leu Thr Thr Glu Gly Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Thr Gln Thr Leu Val Thr Leu His Asp Asn Asn Gly Thr Lys
165 170 175

Ile Ser Thr Trp Ala Asp Glu Ile Lys Asp Ser Gly Glu Thr Ile Arg
180 185 190

Thr Ala Val His Ile Gly Val Gly Val Ser Ala Gly Leu Ala Leu Ala
195 200 205

Leu Ile Leu Gly Val Leu Ile Leu Lys Trp Tyr Ser Ser Lys Lys Lys
210 215 220

Lys Leu Gln Asp Leu Ser Leu Ile Thr Leu Ala Asn Ser Pro Pro Gly
225 230 235 240

Gly Leu Val Asn Ala Gly Ala Gly Arg Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile
245 250 255

Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Ile Tyr Glu Met Glu Asn Ser Asn Glu Tyr
260 265 270

Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Gln Gln Pro Ser
275 280

<210> 240

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secvență Artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 240

10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- YOSHIKANE KIKUSHIGE ET AL: "TIM-3 as a novel therapeutic target for eradicating acute myelogenous leukemia stem cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 98, no. 6, 18 September 2013 (2013-09-18), pages 627-633, XP055181432, ISSN: 0925-5710, DOI: 10.1007/s12185-013-1433-6
- EP-A1- 2 581 113
- MARK AYERS ET AL: "IFN-[gamma]-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 127, no. 8, 1 August 2017 (2017-08-01), pages 2930-2940, XP055608325, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI91190
- WO-A2-2013/006490
- NIKI KARACHALIOU ET AL: "Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients", THERAPEUTIC ADVANCES IN MEDICAL ONCOLOGY, vol. 10, 1 January 2018 (2018-01-01), XP055725751, ISSN: 1758-8359, DOI: 10.1177/1758834017749748
- WO-A2-2016/144803
- SEIWERT TANGUY Y ET AL: "Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial", THE LANCET ONCOLOGY, ELSEVIER LTD, vol. 17, no. 7, 1 July 2016 (2016-07-01), pages 956-965, XP002762502, ISSN: 1474-5488

(57) Revendicări:

1. Anticorp anti-TIM-3 sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, caracterizat prin aceea că respectivul anticorp cuprinde secvențele de aminoacizi H-CDR1-3 și L-CDR1-3 din SECV ID NR: 7-12, respectiv, și unde respectivul anticorp sau respectiva porțiune de legare la antigen crește secreția de IFN- γ și TNF- α într-o analiză de reacție limfocitară mixtă unidirecțională.

2. Anticorp anti-TIM-3 sau porțiune de legare la antigen conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că respectivul anticorp cuprinde un HC și un LC ale căror domenii variabile au secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și 4, respectiv.

3. Anticorp anti-TIM-3 sau porțiune de legare la antigen conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că respectivul HC și respectivul LC cuprind suplimentar secvențele de aminoacizi din:

i) SECV ID NR: 5 și 6, respectiv; sau

ii) SECV ID NR: 25 și 6, respectiv.

4. Anticorp anti-TIM-3 conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că respectivul anticorp cuprinde un HC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 15 și 25 și un LC care cuprinde secvențele de aminoacizi din SECV ID NR: 4 și 6.

5. Anticorp anti-TIM-3 conform revendicării 1 sau 2, caracterizat prin aceea că anticorpul cuprinde cel puțin o mutație în regiunea F_C, unde mutația este opțional în una sau mai multe dintre pozițiile de aminoacizi ale lanțului greu 228, 233, 234 și 235, care sunt numerotate în conformitate cu schema de numerotare IMGT, și unde unul sau ambele dintre reziduurile de aminoacizi la pozițiile 234 și 235 suferă, opțional, mutație la Ala, și/sau unde reziduul de aminoacid de la poziția 228 suferă, opțional, mutație la Pro.

6. Anticorp anti-TIM-3 sau porțiune de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-5, caracterizat prin aceea că anticorpul sau porțiunea are cel puțin una dintre următoarele proprietăți:

a) se leagă la TIM-3 uman cu o K_D de 23 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață;

b) se leagă la TIM-3 de cynomolgus cu o K_D de 22 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață;

c) se leagă la TIM-3 uman cu o EC₅₀ de 1,2 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin ELISA;

d) se leagă la TIM-3 de cynomolgus cu o EC₅₀ de 46 nM sau mai mică, așa cum este măsurată prin ELISA;

e) crește secreția de IFN- γ într-o analiză de reacție limfocitară mixtă bidirecțională;

f) crește secreția de TNF- α din celulele dendritice; și

g) inhibă interacțiunea TIM-3 cu fosfatidilserina.

7. Moleculă de acid nucleic izolată care cuprinde o secvență de nucleotide care codifică lanțul greu sau o porțiune de legare la antigen a acestuia și o secvență de nucleotide care codifică lanțul ușor sau o porțiune de legare la antigen a acestuia din anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-6.

8. Vector care cuprinde molecula de acid nucleic izolată conform revendicării 7, caracterizat prin aceea că respectivul vector cuprinde suplimentar o secvență de control al exprimării.

9. Celulă gazdă care cuprinde o secvență de nucleotide care codifică lanțul greu sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, și o secvență de nucleotide care codifică lanțul ușor sau o porțiune de legare la antigen a acestuia, din anticorpul anti-TIM-3 sau porțiunea de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-6.

10. Metodă pentru producerea unui anticorp anti-TIM-3 sau a unei porțiuni de legare la antigen a acestuia, care cuprinde furnizarea unei celule gazdă conform revendicării 9, cultivarea respectivei celule gazdă în condiții adecvate pentru exprimarea anticorpului sau porțiunii, și izolarea anticorpului rezultat sau porțiunii rezultate.

11. Moleculă de legare bispecifică având o porțiune de legare la antigen a unui anticorp anti-TIM-3 conform oricăreia dintre revendicările 1-6 și o porțiune de legare la antigen a altui anticorp distinct.

12. Anticorp anti-TIM-3 sau porțiune de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-6, sau o moleculă de legare bispecifică conform revendicării 11, pentru utilizare la creșterea imunității la un pacient care are nevoie de acest lucru.

13. Anticorp anti-TIM-3 sau porțiune de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-6, sau o moleculă de legare bispecifică conform revendicării 11, pentru utilizare în tratarea cancerului la un pacient care are nevoie de acest lucru.

14. Anticorp, porțiune de legare la antigen, sau moleculă de legare bispecifică pentru utilizare conform revendicării 13, unde pacientul are un cancer care are originea în piele, plămân, intestin, ovar, creier, prostată, rinichi, țesuturi moi, sistemul hematopoietic, cap și gât, ficat, vezică urinară, sân, stomac, uter, sau pancreas.

15. Anticorp, porțiune de legare la antigen, sau moleculă de legare bispecifică pentru utilizare conform revendicării 13, unde pacientul are leucemie, limfom Hodgkin, limfom non-Hodgkin, o tumoră solidă, melanom, cancer pulmonar fără celule mici, cancer colorectal, sau carcinom cu celule renale.

Figura 1

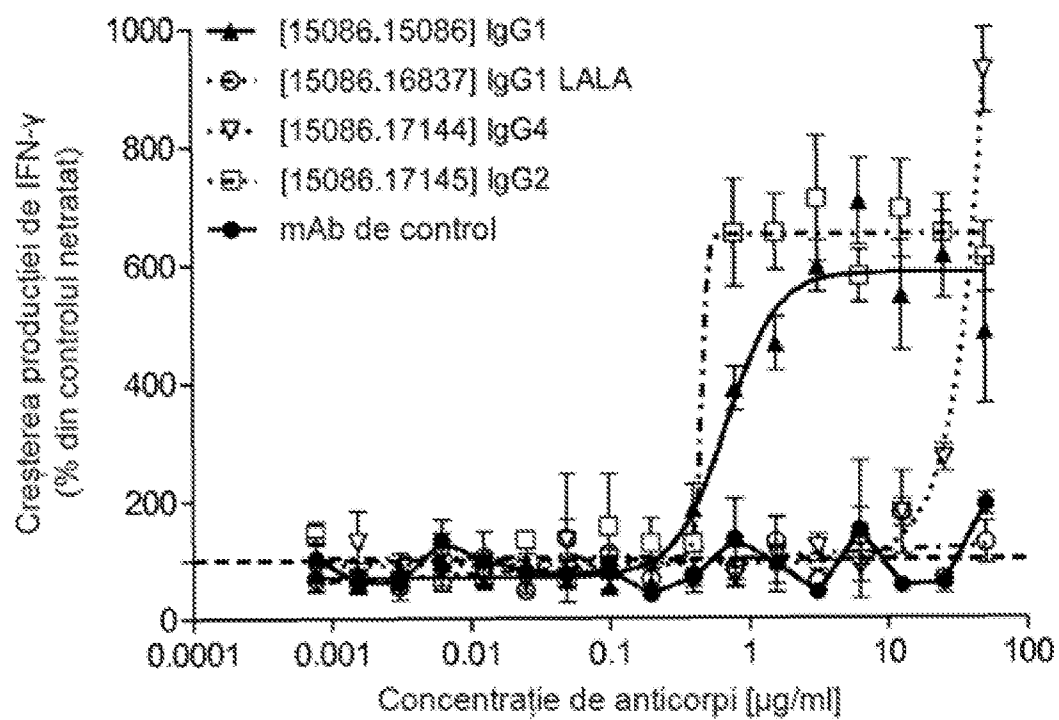


Figura 2

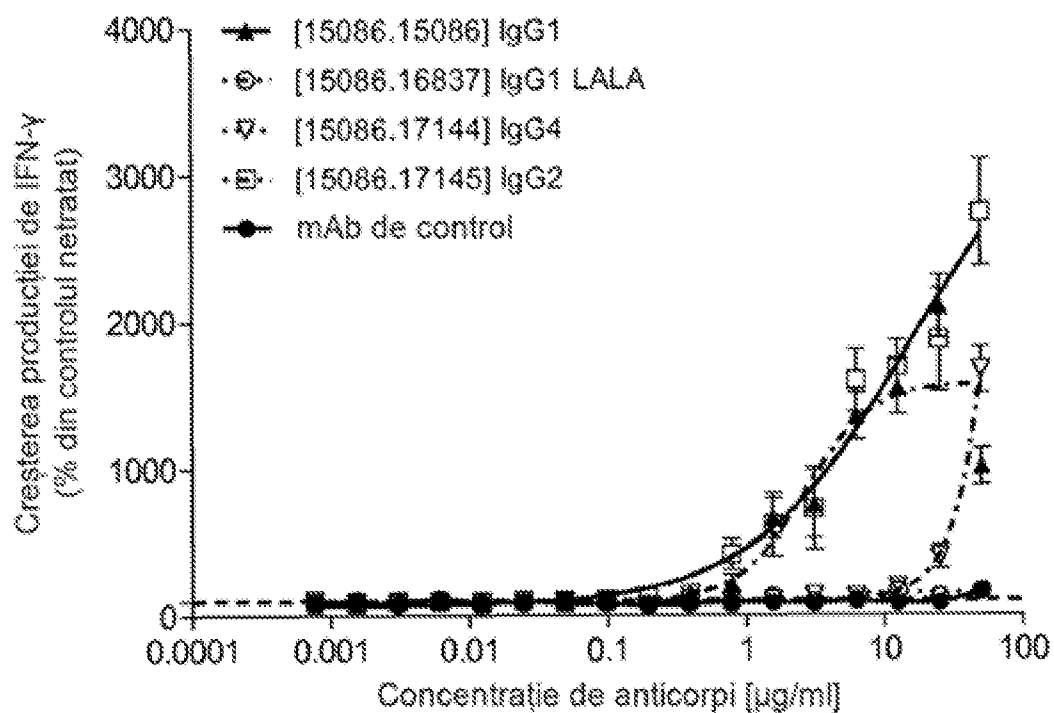


Figura 3

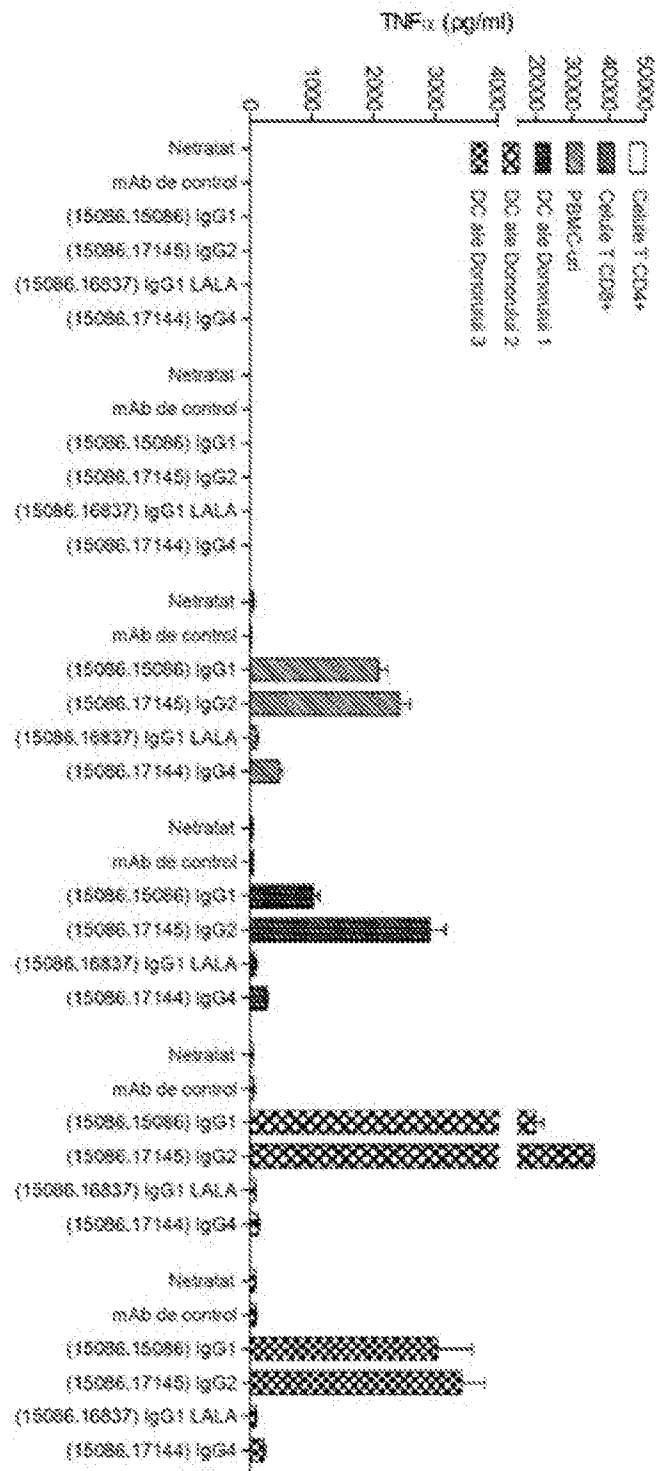
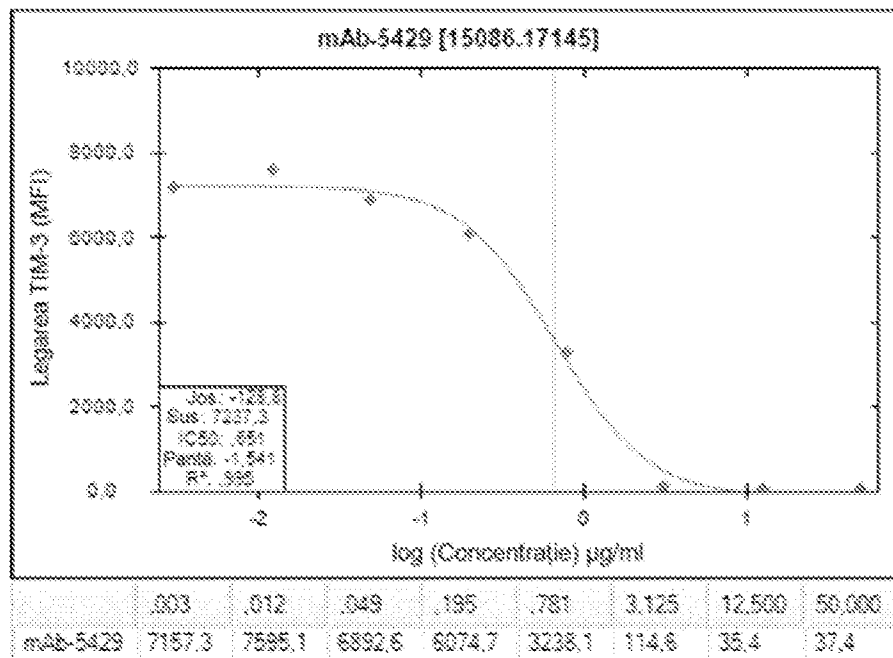


Figura 4

A



B

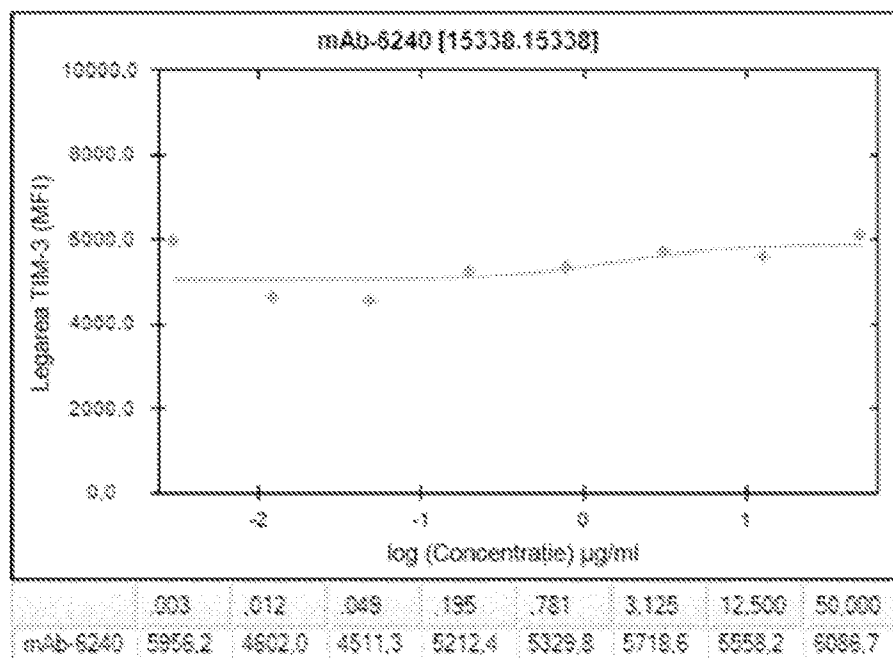
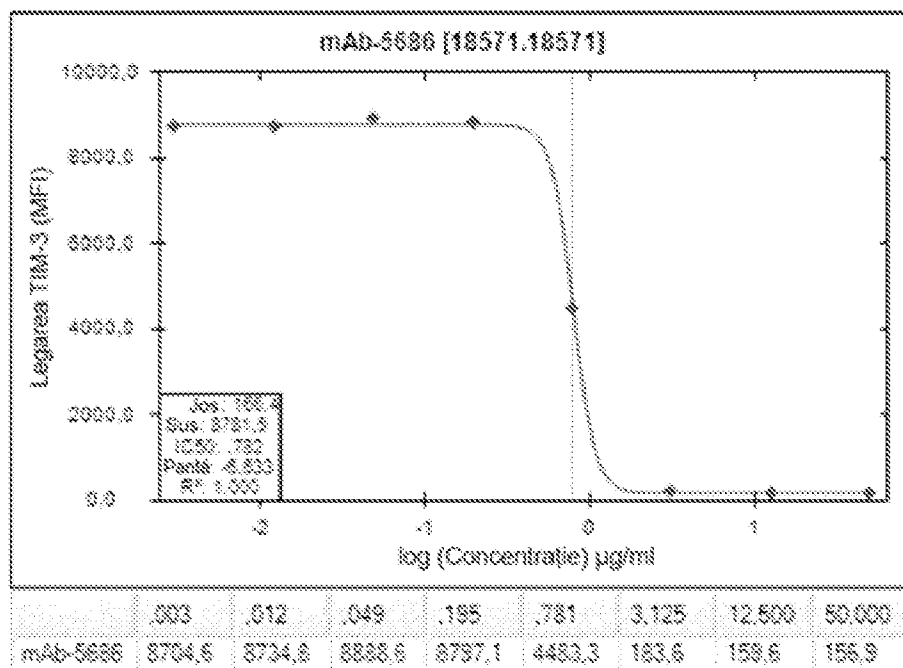


Figura 4 (continuare)

C



D

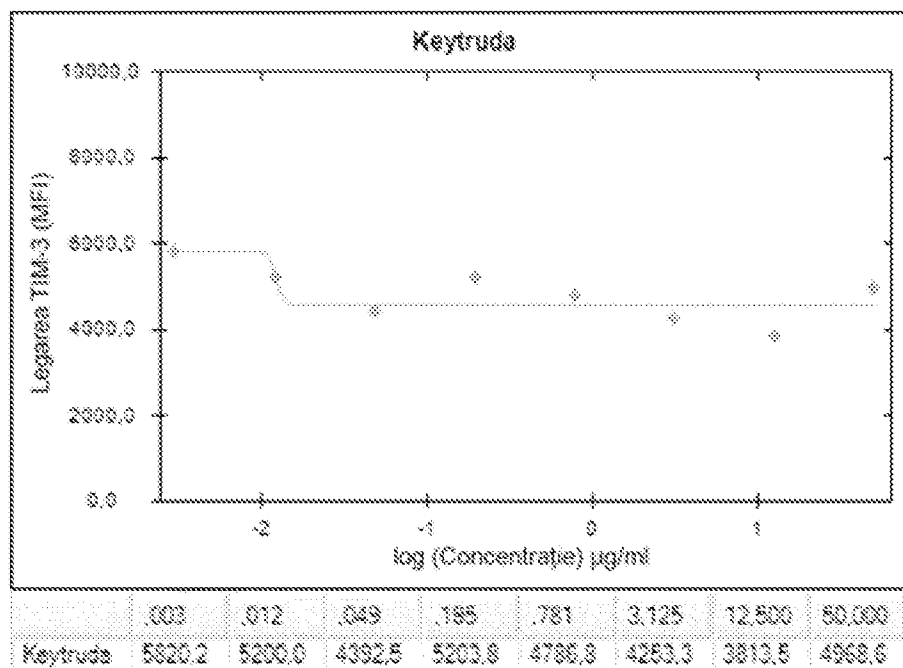


Figura 5

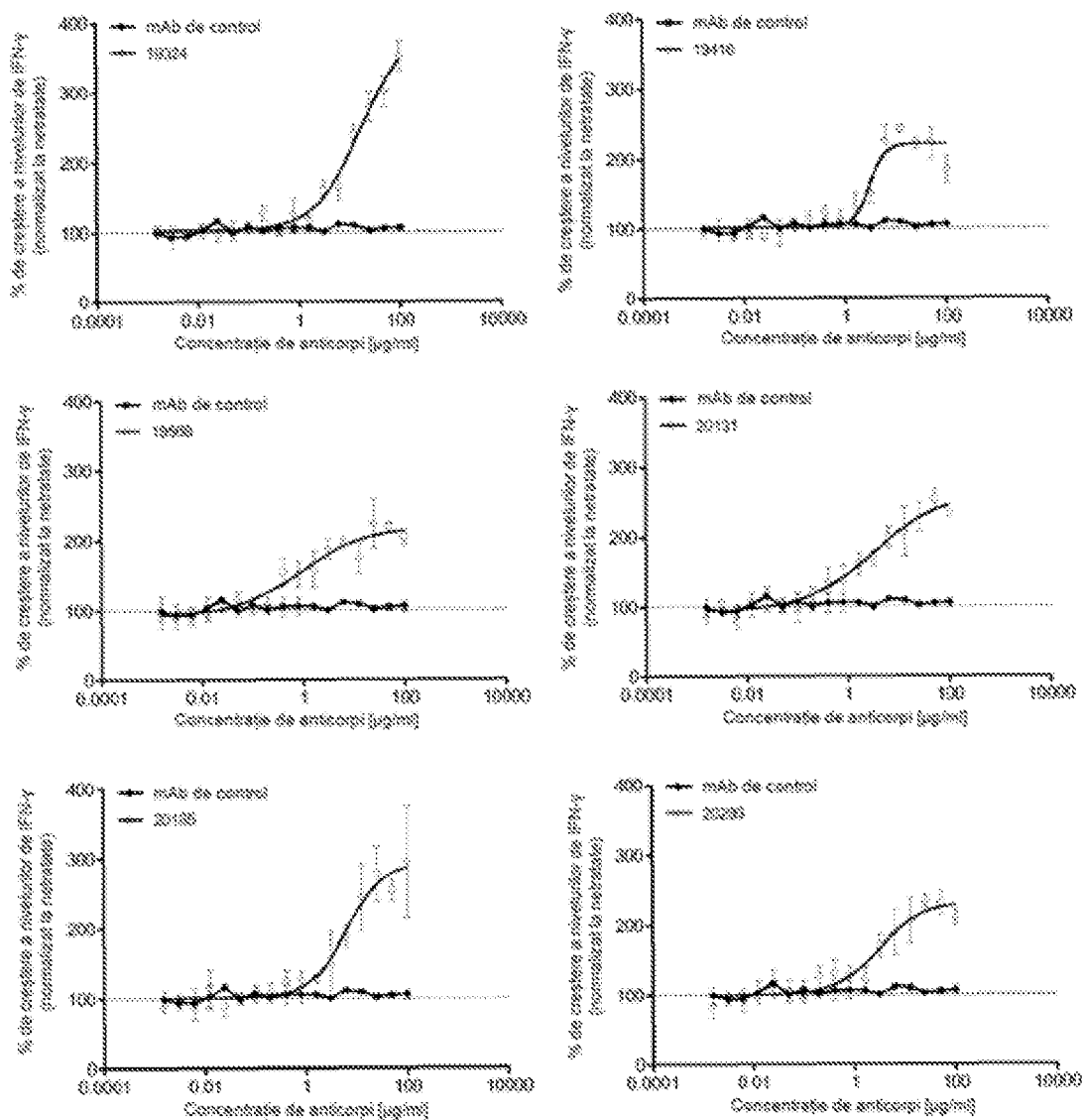


Figura 5 (continuare)

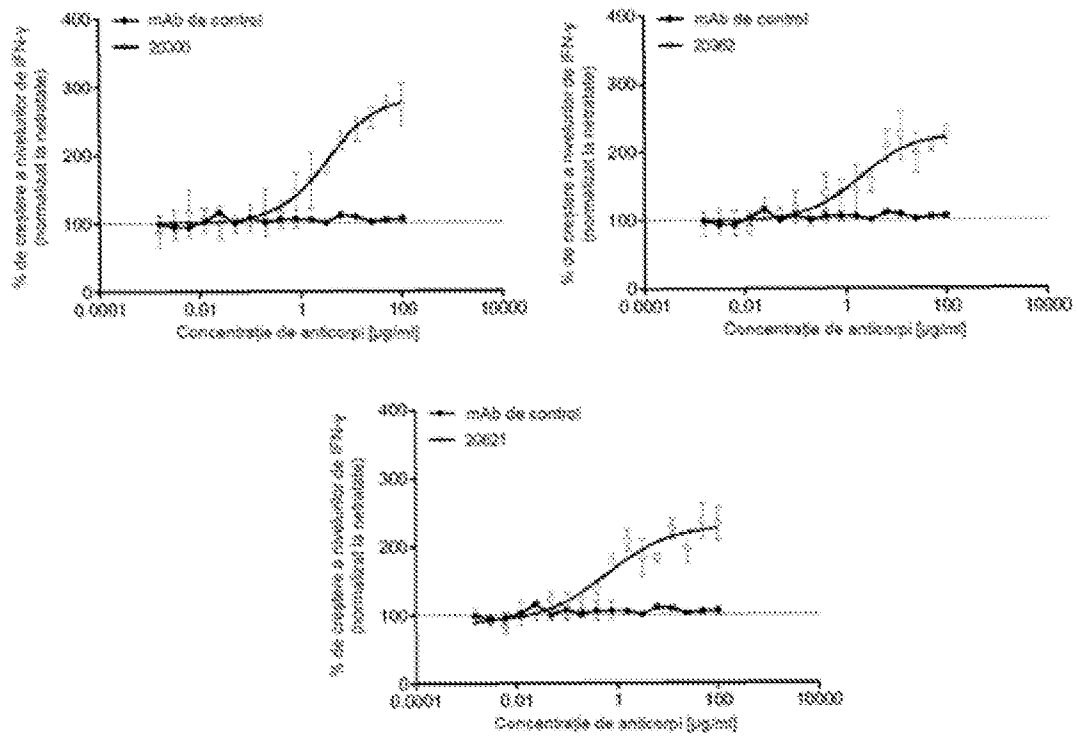


Figure 1 consists of six graphs arranged in a 3x2 grid, showing the percentage of capture and revelation of 97H4 virus (normalized to the negative) versus the concentration of antibodies (µg/ml) on a logarithmic scale. The y-axis ranges from 0 to 600, and the x-axis ranges from 0.0001 to 10000 µg/ml. Each graph compares a control mAb (mAb de controle) and a specific mAb (10024, 10066, 20101, or 20105). The control mAb shows a sharp increase in capture and revelation at high concentrations, while the specific mAbs show a more gradual increase.

Figura 6 (continuare)

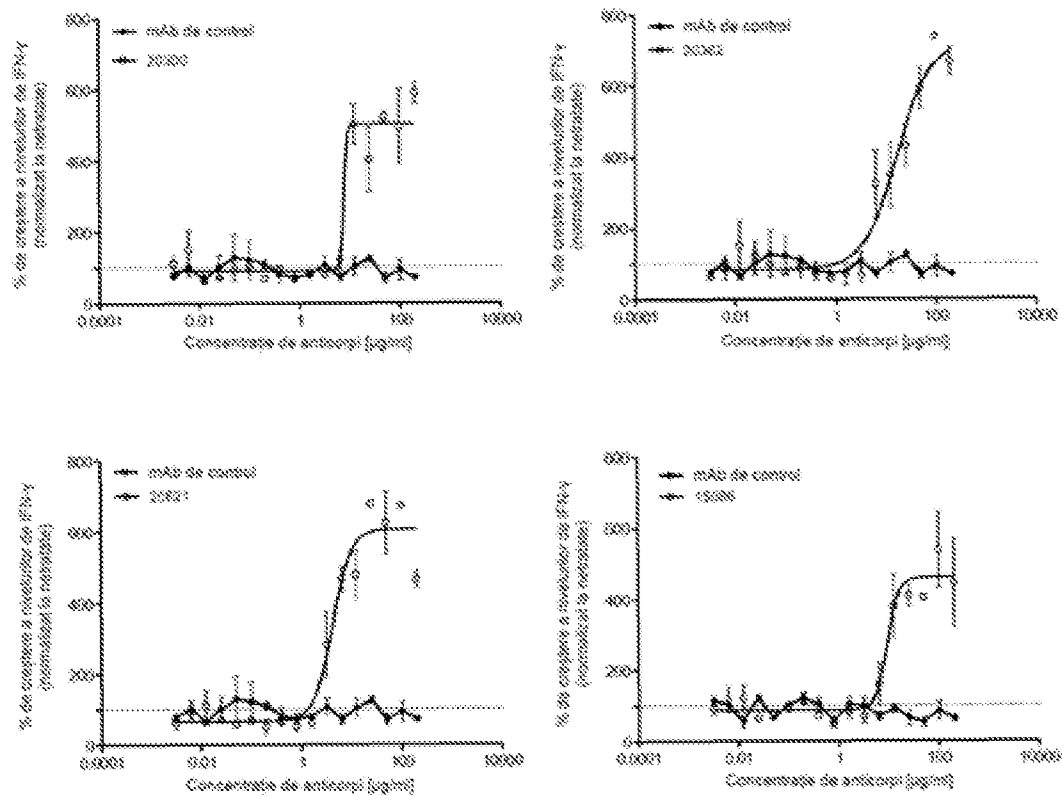


Figura 7

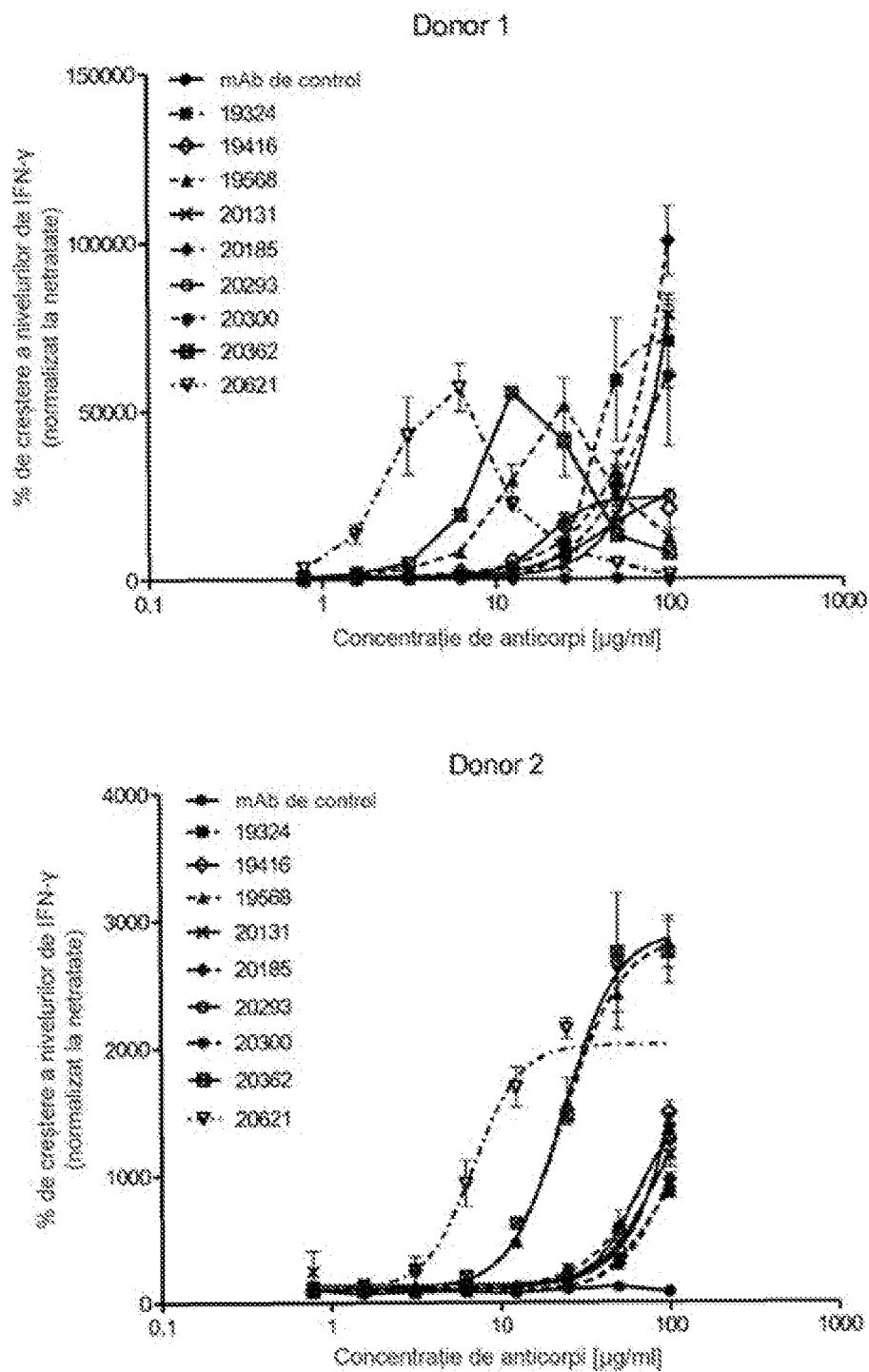


Figura 8

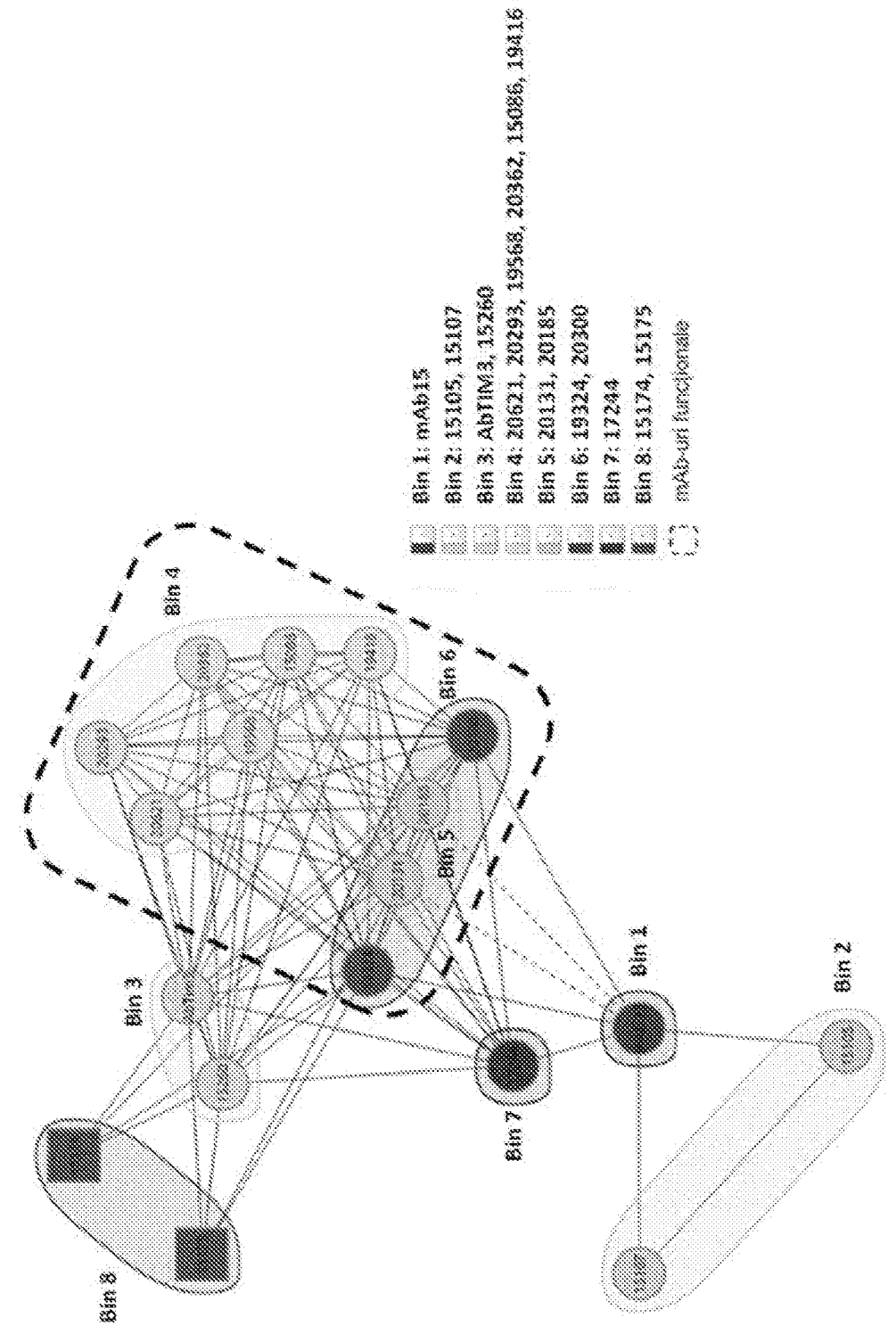


Figura 9

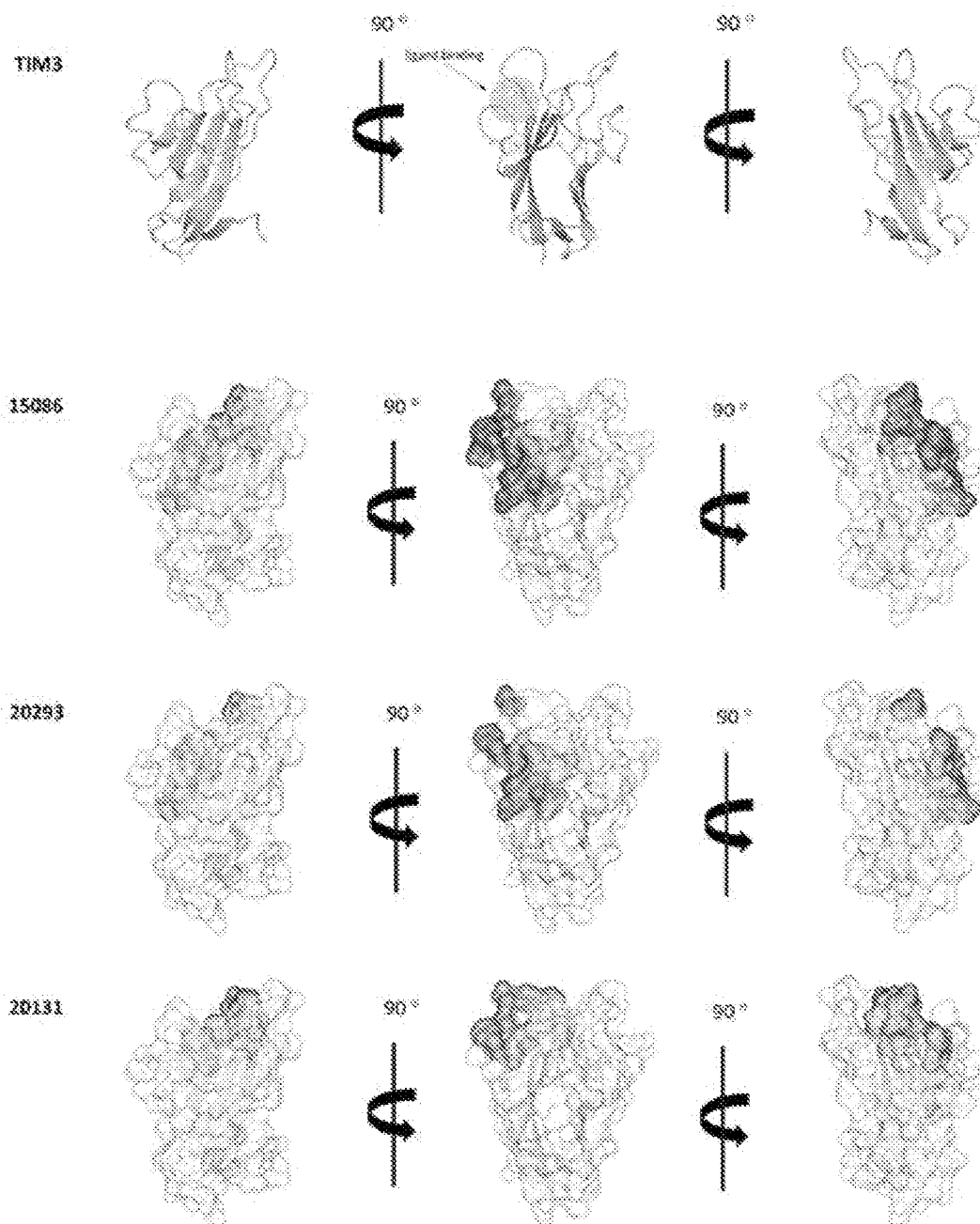


Figura 9 (continuare)

