



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128388** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**C12P 21/08** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2020 00367**
(22) Дата подання заявки: **25.07.2018**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **04.07.2024**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/539,687**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **01.08.2017**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: **US**
(41) Публікація відомостей про заяву: **12.05.2020, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **03.07.2024, Бюл.№ 27**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ **PCT/US2018/043632, 25.07.2018**

(72) Винахідник(и):
**Фрай Крістофер Карл (US),
Калос Майкл Дьюейн (US),
Котанідес Хелен (US),
Сандефур Стефані Лінн (US)**
(73) Володілець (володільці):
ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ,
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana
46285, United States of America (US)
(74) Представник:
**Шляховецький Ілля Олександрович,
реєстр. №190**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 8337850 B2, 25.12.2012
US 7288638 B2, 30.10.2007
US 2016244528 A1, 25.08.2016
WO 03049755 A1, 19.06.2003
Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer / Zhiqiang Guo et al. Journal of translational medicine. 2013. Vol. 11 (1). P. 215
Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity / T. S. Fisher et al. Cancer immunology. 2012. Vol. 61 (10). P. 1721-1733

(54) АНТИТІЛО ДО CD137**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла, яке зв'язується з людським CD137, демонструє агоністичну активність, і може бути придатними для лікування солідних та гематологічних пухлин окремо або в комбінації з хіміотерапією та іонізуючим випроміненням.

UA 128388 C2

Цей винахід належить до галузі медицини. Зокрема, цей винахід стосується агоністичних антитіл, спрямованих проти людського CD137, композицій, які містять такі агоністичні антитіла проти людського CD137, та способів застосування таких агоністичних антитіл проти людського CD137 для лікування солідних та гематологічних пухлин окремо або в комбінації з хіміотерапією та іншими терапіями раку.

Наразі відомо, що посилення протипухлинної імунної відповіді може бути ефективним засобом терапії раку. Щодо цього, то CD137, також відомий як 4-1BB, належить до родини рецепторів TNF і відіграє роль в активації Т-клітинних імунних реакцій, наприклад, шляхом стимулювання проліферації та ефекторних функцій Т-клітин, сприяння імунологічній пам'яті та інгібування індукованої активацією загибелі клітин. Агоністичні антитіла, орієнтовані на CD137, на мишачих моделях пухлин показали перспективність як монотерапія (Melero. I. et al., Nat. Med. 3(6):682-685 (1997)), однак агоністичні антитіла, орієнтовані на людський CD137, ще не продемонстрували достатніх реакцій як монотерапія або комбінована терапія для пацієнтів-людей. Щодо цього, то ні утомілумаб (utomilumab) (повністю людське агоністичне IgG2 моноклональне антитіло (mAb) проти CD137) (Fisher, T.M. et al, Cancer Immunol. Immunother. (2012) 61:1721-1733), ні урелумаб (urelumab) (гуманізоване агоністичне IgG4 mAb проти CD137) (Segal, N.H. Clin. Cancer Res. (2017) 23(8): 1929-1936) не одержали схвалення регуляторного органу на застосування у формі монотерапії або навіть як комбінованої терапії. На цей час жодне агоністичне антитіло, спрямоване на людський CD137, не було схвалено для терапевтичного застосування у людей.

Таким чином, існує потреба у додаткових повністю людських антитілах, які агонізують рецептор CD137 людини та сприяють надійній протираковій імунній відповіді, але з прийнятними профілями токсичності. Існує також потреба в альтернативних агоністичних антитілах проти людського CD137, які можна комбінувати з іншими терапевтичними засобами для лікування раку. Зокрема, також залишається потреба у антитілах проти людського CD137, які проявляють достатню ефективність як монотерапія раку та/або як комбінована терапія раку.

Не обмежуючись теорією, вважається, що застосування сучасних орієнтованих на CD137 агоністичних антитіл у формі монотерапії раку та/або як комбінованого засобу гальмується такими факторами, як агоністична ефективність згаданих антитіл та пов'язані з імунітетом побічні явища, які виникають внаслідок їх застосування у високих потенційно ефективних дозах. Зокрема, поточні антитіла або надто сильні, що призводить до побічних явищ, або виявляють субоптимальну ефективність.

Агоністичні антитіла проти людського CD137, розкриті в цьому описі, є повністю людськими ефекторними нульовими антитілами, опосередкованими рецептором Feγ, які у формі монотерапії зв'язують людський CD137 та CD137 макак-крабодів, стимулюють активацію Т-клітин *in vitro*, сприяють експресії людського поверхневоклітинного CD137, посилюють активність транскрипційного фактора NF-каппаB, інгібують ріст пухлин в мишачих моделях пухлин недрібноклітинного раку легенів, у разі монотерапії інгібують Т-регуляторну клітинно-опосередковану супресію *in vitro*, активують сигнатури генів імунної відповіді, збільшують частоту внутрішньопухлинних CD3⁺ Т-клітин, конкурують з людським лігандом CD137 за зв'язування з людським CD137 та зв'язуються з унікальними амінокислотними залишками на людському CD137.

Цим винаходом надане антитіло проти людського CD137 (SEQ ID NO: 1), що включає HCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, HCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, HCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6, і LCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

Цим винаходом надане антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9. Цим винаходом надане антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

Цим винаходом надане антитіло, що включає важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11. Цим винаходом надане антитіло, що включає важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13.

Цим винаходом надана клітина ссавця, здатна експресувати антитіло, що включає HCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, HCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, HCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR1, що має

Цим винаходом надане антитіло, яке агонізує людський CD137 (SEQ ID NO: 1), або фармацевтична композиція, яка містить згадане антитіло, для застосування при лікуванні раку або для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, при цьому згадане антитіло не зв'язує людський FcγRI, людський FcγRIIa, людський FcγRIIb, людський FcγRIIIa(F), людський FcγRIIIa(V), або людський Clq; й при цьому згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози. Цим винаходом надане антитіло, яке агонізує людський CD137 (SEQ ID NO: 1), для застосування в лікуванні раку або для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, при цьому згадане антитіло не зв'язує людський FcγRI, людський FcγRIIa, людський FcγRIIb, людський FcγRIIIa(F), людський FcγRIIIa(V), або людський Clq; й при цьому згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.

Цим винаходом надане антитіло, яке агонізує людський CD137 (SEQ ID NO: 1), де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує щонайменше з одним з таких амінокислотних залишків на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг контактує щонайменше з одним з таких амінокислотних залишків на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно).

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує щонайменше з одним з таких амінокислотних залишків на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг контактує щонайменше з одним з таких амінокислотних залишків на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно); й при цьому залишки, що контактують, знаходяться в межах шести (6) ангстрем або менше від згаданого антитіла, як визначено із застосуванням рентгенівської кристалографії.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно).

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно); й при цьому згадані залишки, що контактують, знаходяться в межах шести (6) ангстрем або менше від згаданого антитіла, як визначено із застосуванням рентгенівської кристалографії.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг факультативно контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно).

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг факультативно контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно); й при цьому згадані залишки, що контактують, знаходяться в межах шести (6) ангстрем або менше від згаданого антитіла, як визначено із застосуванням рентгенівської кристалографії.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для застосування в лікуванні раку, де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й згаданий легкий ланцюг факультативно контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно); при цьому згадані залишки, що контактують, знаходяться в

межах шести (6) ангстрем або менше від згаданого антитіла, як визначено із застосуванням рентгенівської кристалografії.

Цим винаходом запропоноване застосування антитіла, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг факультативно контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно); при цьому згадані залишки, що контактують, знаходяться в межах шести (6) ангстрем або менше від згаданого антитіла, як визначено із застосуванням рентгенівської кристалografії.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для застосування в лікуванні раку, де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг факультативно контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно); при цьому згадані залишки, що контактують, знаходяться в межах шести (6) ангстрем або менше від згаданого антитіла, як визначено із застосуванням рентгенівської кристалografії; й при цьому згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.

Цим винаходом запропоноване застосування антитіла, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, де згадане антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг; при цьому згаданий важкий ланцюг контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включно) і 112-116 (включно); й при цьому згаданий легкий ланцюг факультативно контактує з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 96-98 (включно), 100 та 114-116 (включно); й при цьому згадані залишки, що контактують, знаходяться в межах шести (6) ангстрем або менше від згаданого антитіла, як визначено із застосуванням рентгенівської кристалografії; при цьому згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), й при цьому згадане антитіло зв'язує щонайменше один з таких амінокислотних залишків на людському CD137: 97 та 115.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), й при цьому згадане антитіло зв'язує щонайменше два з амінокислотних залишків на людському CD137: 97, 114 та 115.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), й при цьому згадане антитіло зв'язується з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 97, 114 та 115.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), й при цьому згадане антитіло зв'язує щонайменше один з таких амінокислотних залишків на людському CD137: 97 та 115; при цьому зв'язування визначено, із застосуванням мутантного людського білка CD137, який має мутацію на одному або більше з таких амінокислотних залишків: 97, 114 та 115.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), й при цьому згадане антитіло зв'язує щонайменше два з амінокислотних залишків на людському CD137: 97, 114 та 115; при цьому зв'язування визначено, із застосуванням мутантного людського білка CD137, який має мутацію на одному або більше з таких амінокислотних залишків: 97, 114 та 115.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для застосування в лікуванні раку, й при цьому згадане антитіло зв'язується з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 97, 114 та 115; де зв'язування визначено із застосуванням мутантного людського білка CD137, який має мутацію на одному або більше з таких амінокислотних залишків: 97, 114 та 115.

Цим винаходом запропоноване застосування антитіла, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, при цьому згадане антитіло зв'язується з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 97, 114 та 115;

й при цьому зв'язування визначено із застосуванням мутантного людського білка CD137, який має мутацію на одному або більше з таких амінокислотних залишків: 97, 114 та 115.

Цим винаходом надане антитіло, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для застосування в лікуванні раку, й при цьому згадане антитіло зв'язується з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 97, 114 та 115; при цьому зв'язування визначено, із застосуванням мутантного людського білка CD137, який має мутацію на одному або більше з таких амінокислотних залишків: 97, 114 та 115; при цьому згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.

Цим винаходом запропоноване застосування антитіла, яке є агоністом людського CD137 (SEQ ID NO: 1), для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, при цьому згадане антитіло зв'язується з такими амінокислотними залишками на людському CD137: 97, 114 та 115; й при цьому зв'язування визначено, із застосуванням мутантного людського білка CD137, який має мутацію на одному або більше з таких амінокислотних залишків: 97, 114 та 115; при цьому згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.

Цим винаходом надане повністю людське агоністичне антитіло проти CD137, яке має дві або більше з таких відмітних ознак: (a) згадане антитіло конкурує з лігандом людського CD137 за зв'язування з людським CD137; (b) згадане антитіло не зв'язує людський FcγRI, людський FcγRIIa, людський FcγRIIb, людський FcγRIIIa(F), людський FcγRIIIa(V) або людський C1q; (c) згадане антитіло зв'язується з CD137 макак-крабодідів; (d) згадане антитіло інгібує розростання пухлини недрібноклітинного раку легенів людини як монотерапія; та (e) згадане антитіло збільшує частоту появи внутрішньопухлинних CD3⁺ Т-клітин.

Необмежувальні приклади прийнятих хіміотерапевтичних препаратів охоплюють 5-фторурацил (5-fluorouracil), гідроксисечовину (hydroxyurea), гемцитабін (gemcitabine), метотрексат (methotrexate), доксорубіцин (doxorubicin), етопозид (etoposide), карбоплатин (carboplatin), цисплатин (cisplatin), циклофосфамід (cyclophosphamide), мелфалан (melphalan), дакарбазин (dacarbazine), таксол (taxol), камптотецин (camptothecin), FOLFIRI, FOLFOX, доцетаксел (docetaxel), даунорубіцин (daunorubicin), паклітаксел (paclitaxel), оксаліплатин (oxaliplatin) та їх комбінації.

Термін "антитіло" у значенні, вживаному у цьому описі, відноситься до поліпептидного комплексу, який має два важкі ланцюги (HC) і два легкі ланцюги (LC), де вказані важкі ланцюги і легкі ланцюги з'єднані між собою дисульфідними зв'язками; при цьому згадане антитіло є антитілом підкласу IgG.

Антитіло за цим винаходом є генно-інженерним штучним поліпептидним комплексом. Молекула ДНК за цим винаходом є молекулою ДНК, яка включає штучну полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність щонайменше одного з поліпептидів в антитілі за цим винаходом.

Антитіло за цим винаходом є антитілом типу IgG і має "важкі" ланцюги та "легкі" ланцюги, зшиті між собою внутрішньо- та міжланцюговими дисульфідними зв'язками. Кожен важкий ланцюг складається з N-кінцевої HCVR та константної ділянки важкого ланцюга ("HCCR"). Кожен легкий ланцюг складається з LCVR та константної ділянки легкого ланцюга ("LCCR"). Якщо антитіла, які мають нативні послідовності Fc людини, експресуються в певних біологічних системах, то вони глікозилюються на Fc-ділянці. Глікозилювання, як правило, відбувається на Fc-ділянці антитіла на висококонсервативному сайті N-глікозилювання. N-глікани зазвичай приєднуються до аспарагіну. Антитіла можуть також глікозилюватись і в інших положеннях.

Факультативно антитіла проти людського CD137, розкриті в цьому описі, містять Fc-фрагмент, який походить від людського IgG1. Добре відомо, що IgG1 зв'язується з білками родини рецепторів Fc-гамма (FcγR) так само як C1q. Взаємодія з цими рецепторами може індукувати антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) і комплемент-залежну цитотоксичність (CDC). Таким чином, антитіла проти людського CD137, розкриті в цьому описі, факультативно є повністю людськими моноклональними антитілами, яким бракує Fc-ефекторної функції (IgG1 з нульовою ефекторною функцією). Для одержання IgG1 антитіла з нульовою ефекторною функцією необхідним є селективний мутагенез залишків на ділянці CH2 Fc-фрагменту IgG1. Амінокислотні заміни L234A, L235E і G237A вводять в Fc-фрагмент IgG1 для зменшення зв'язування з FcγRI, FcγRIIa і FcγRIII, а заміни A330S і P331S вводять для зменшення C1q-опосередкованого зв'язування комплексу. Для зменшення можливого

спричинення імунної відповіді при введенні дози людям, певні амінокислоти можуть потребувати зворотних мутацій, щоб відповідати послідовностям зародкової лінії антитіл.

HCVR та LCVR можуть додатково підрозділятися на гіперваріабельні ділянки, які називаються ділянками, які обумовлюють комплементарність ("CDR"), що чергуються з більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками ("FR"). Кожна HCVR та LCVR складається з трьох CDR та чотирьох FR, які розміщуються у напрямку від аміно-кінця до карбоксильного кінця у такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. У цьому описі на три CDR важкого ланцюга посилаються як "HCDR1, HCDR2 та HCDR3", а на три CDR легкого ланцюга посилаються як "LCDR1, LCDR2 та LCDR3". CDR містять більшу частину залишків, які утворюють специфічні взаємозв'язки з антигеном. Для цілей цього винаходу застосовують визначення CDR за схемою нумерації, яка розроблена Нортон. Визначення CDR за схемою нумерації, яка розроблена Нортон (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)), базується на кластеризації поширення афінності з великою кількістю кристалічних структур.

Виділена ДНК, що кодує HCVR, може бути перетворена на непроцесований ген важкого ланцюга шляхом функціонального зв'язування ДНК, що кодує HCVR, з іншою молекулою ДНК, що кодує константні ділянки важкого ланцюга. Послідовності генів константної ділянки важкого ланцюга людини, як і інших ссавців, відомі в цій галузі. Фрагменти ДНК, що охоплюють ці ділянки, можуть бути одержані, наприклад, шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації.

Виділена ДНК, що кодує LCVR, може бути перетворена на непроцесований ген легкого ланцюга шляхом функціонального зв'язування ДНК, що кодує LCVR, з іншою молекулою ДНК, що кодує константну ділянку легкого ланцюга. Послідовності генів константної ділянки легкого ланцюга людини, як і інших ссавців, відомі в цій галузі. Фрагменти ДНК, що охоплюють ці ділянки, можуть бути одержані шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації. Константна ділянка легкого ланцюга може бути константною ділянкою типу каппа або лямбда. Переважно, константною ділянкою легкого ланцюга для антитіл за цим винаходом є константна ділянка типу каппа.

Полінуклеотиди за цим винаходом будуть експресуватись в клітині-хазяїні після функціонального сполучення послідовностей з контрольною послідовністю експресії. Експресійні вектори зазвичай реплікуються в організмах-хазяях або як епісоми, або як складова частина хромосомної ДНК хазяїна. Зазвичай для надання можливості виявлення клітин, трансформованих бажаними послідовностями ДНК, експресійні вектори будуть містити селекційні маркери, наприклад, тетрациклін, неоміцин та дигідрофолатредуктазу.

Антитіло за цим винаходом може легко продукуватись в клітинах ссавців, необмежувальні приклади яких охоплюють клітини CHO, NSO, HEK293 або COS. Згадані клітини-хазяї культивуються за методиками, які добре відомі в цій галузі.

Вектори, які містять полінуклеотидні послідовності, які становлять інтерес (наприклад, полінуклеотиди, які кодують поліпептиди антитіла та контрольні послідовності експресії), можуть бути перенесені в клітину-хазяїна добре відомими способами, які різняться залежно від типу клітинного хазяїна.

Можуть бути застосовані різні методи очищення білка, і такі методи відомі в цій галузі і описані, наприклад, у Deutscher, *Methods in Enzymology* 182:83-89 (1990) та Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

В інших варіантах здійснення цього винаходу антитіло або нуклеїнові кислоти, які їх кодують, надаються в виділеній формі. У значенні, вживаному у цьому описі, термін "виділений" стосується білка, пептиду або нуклеїнової кислоти, які є вільними або по суті вільними від будь-яких інших видів макромолекул, виявлених у клітинному середовищі. Словосполучення "по суті вільними" у значенні, вживаному у цьому описі, означає білок, пептид або нуклеїнову кислоту, які становлять інтерес, й вміст яких становить більше ніж 80 % (на молярній основі) від макромолекул наявних видів, за варіантом, якому віддають перевагу, більше ніж 90 % і за варіантом, якому віддають більшу перевагу, більше ніж 95 %.

Антитіло за цим винаходом або фармацевтичні композиції, які містять його, можуть вводитись парентеральними шляхами, необмежувальним прикладом яких є внутрішньовенне введення. Антитіло за цим винаходом може бути введене пацієнту лише з фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або допоміжними речовинами однією дозою або множиною доз. Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути одержані способами, добре відомими в цій галузі (наприклад, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press), і містити антитіло, яке розкрито у цьому описі, і один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або допоміжних речовин.

Схеми прийому лікарського засобу можуть бути скориговані для забезпечення оптимальної бажаної реакції (наприклад, терапевтичного ефекту). Терапевтичні дози можна титрувати для оптимізації безпеки та ефективності. Схеми застосування лікарського засобу для внутрішньовенного (i.v.) або не внутрішньовенного введення, локалізованого або системного, або їх комбінації, зазвичай коливатимуться від однієї ударної дози або безперервної інфузії до множини введень на добу (наприклад, кожні 4-6 год.), або так, як призначено лікарем-клініцистом та визначено за станом пацієнта. Кількість та частоту дозування може бути визначена лікарями, які лікують пацієнта.

Термін "лікування" (або "лікувати", або "курс лікування") означає уповільнення, переривання, затримання, полегшення, зупинення, зменшення або звертання прогресування або тяжкості існуючого симптому, розладу, стану або захворювання.

"Ефективна кількість" означає кількість антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції, яка містить антитіло за цим винаходом, яка спричинить біологічну або медичну відповідь або бажаний терапевтичний вплив на тканини, систему, тварину, ссавця або людину, яких прагнули дослідник, лікар або інший клініцист. Ефективна кількість антитіла може змінюватись залежно від таких факторів, як стан хвороби, вік, стать і маса людини та здатність антитіла спричинювати бажану реакцію у людини. Ефективною також є така кількість, при якій будь-який токсичний або шкідливий вплив антитіла переважається терапевтично сприятливими результатами.

Визначення характеристик, продукування, експресія та очищення антитіл

Продукування антитіл із застосуванням полінуклеотидної послідовності важкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 14, і полінуклеотидної послідовності легкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 17, в клітинах ссавців призводить до продукування пов'язаних з антитілом продуктів двох видів: (а) повномірною антитілом (на яке у подальшому посилаються як на "Антитіло А1"), що має амінокислотну послідовність важкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 10, і амінокислотну послідовність легкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 11; та (б) антитіла, скороченої на одну амінокислоту форми (на яке у подальшому посилаються як на "Антитіло А2"), одержаного в результаті відсікання N-кінцевого аланіну легкого ланцюга, де Антитіло А2 має амінокислотну послідовність важкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 10, і амінокислотну послідовність легкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 13. У значенні, вживаному у цьому описі, термін "Антитіло А1/2" означає пов'язаний з антитілом продукт, який є результатом застосування полінуклеотидної послідовності легкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 17, і є комбінацією антитіла А1 (~ 6 %) і антитіла А2 (~ 94 %). Антитіло А1 може бути синтезоване без значних кількостей Антитіла А2 із застосуванням полінуклеотидної послідовності важкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 14, і полінуклеотидної послідовності легкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 15. Антитіло А2 може бути синтезоване без значних кількостей Антитіла А1 з із застосуванням полінуклеотидної послідовності важкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 14, і полінуклеотидної послідовності легкого ланцюга, представленої послідовністю SEQ ID NO: 16.

Антитіла за цим винаходом можуть бути одержані із застосуванням відомих методів, в тому числі, але без обмеження ним, фаговим дисплеєм. Крім того, антитіла, одержані так, як описано вище, можуть піддаватись скринінгу із застосуванням описаних у цьому описі досліджень.

Поліпептиди варіабельних ділянок важкого ланцюга і легкого ланцюга, і повні амінокислотні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга антитіл А1 та А2, та нуклеотидні послідовності, що їх кодують, перелічені у розділі, названому "Амінокислотні та нуклеотидні послідовності". Крім того, номери послідовностей (SEQ ID NO) легкого ланцюга, важкого ланцюга, варіабельної ділянки легкого ланцюга та варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіл А1, А2 та А1/2 показані в Таблиці 1 і Таблиці 2.

Таблиця 1

Відповідна послідовність (амінокислотна)	Антитіло A1	Антитіло A2
HCDR1	2	2
HCDR2	3	3
HCDR3	4	4
LCDR1	5	5
LCDR2	6	6
LCDR3	7	7
HCVR	8	8
LCVR	9	12
Важкий ланцюг	10	10
Легкий ланцюг	11	13

Таблиця 2

Відповідна послідовність (ДНК)	Антитіло A1	Антитіло A2	Антитіло A1/2
Важкий ланцюг	14	14	14
Легкий ланцюг	15	16	17

- Антитіла за цим винаходом, в тому числі, але без обмеження ними, антитіла A1, A2 та A1/2, можуть бути одержані та очищені по суті так, як наведено нижче. Відповідна клітина-хазяїн, така як HEK 293 або CHO, може бути транзійтно або стабільно трансфектована системою експресії для секреції антитіл, із застосуванням оптимального заздалегідь визначеного співвідношення векторів HC:LC або єдину систему векторів, яка кодує як HC, так і LC. Просвітлені середовища, в які секретується антитіло, можуть бути очищені із застосуванням будь-якої з багатьох традиційних методик. Наприклад, середовище може бути прийнятним чином нанесене на колонку MabSelect (GE Healthcare) або колонку CapraSelect (GE Healthcare), яка була врівноважена сумісним буфером, таким як забуферений фосфатом фізіологічний розчин (pH 7,4). Колонка може бути промита для видалення компонентів неспецифічного зв'язування. Зв'язане антитіло може бути елюйоване, наприклад, градієнтом pH (таким як від 20 mM розчину трис-буфера (pH 7) до 10 mM натрійцитратного буфера (pH 3,0) або від забуференого фосфатом фізіологічного розчину (pH 7,4) до 100 mM гліцинового буфера (pH 3,0)). Фракції антитіл можуть бути виявлені, наприклад, із застосуванням УФ-абсорбції або SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію), після чого можуть бути об'єднані. Подальше очищення є факультативним, залежно від запланованого застосування. Антитіло може бути сконцентровано та/або стерильно відфільтровано із застосуванням звичайних методів. Розчинний агрегат і мультимери можуть бути ефективно видалені звичайними методами, в тому числі гел-хроматографією за розміром молекул, гідрофобною хроматографією, іонообмінною хроматографією, хроматографією на мультимодальних розділювальних матрицях або гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Продукт може бути негайно заморожений при температурі -70 °C або може бути ліофілізований.
- У значенні, вживаному у цьому описі, BMS20H4.9 відноситься до антитіла, яке має важкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 18, і легкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 19, яке було раніше описано в US7288638. У значенні, вживаному у цьому описі, PF83 відноситься до антитіла, яке має важкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 20, і легкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 21, яке було раніше описано в US8337850.

Антитіло A1/2 зв'язується з людським CD137

- Здатність антитіл, розкритих у цьому описі, зв'язувати людський CD137 може бути виміряна із застосуванням твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA). Для вимірювання зв'язування з людським CD137, 96-лунковий планшет (Nunc) сенсibiliзують людським CD137-Fc (R&D Systems) протягом ночі при температурі 4 °C. Лунки протягом 2 год. блокують із застосуванням блокувального буфера (забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS), який містить 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну і 0,05 % Tween-20). Лунки тричі промивають PBS, який містить 0,05 % Tween-20. Потім додають антитіло A1/2 або контрольний IgG (100 мікролітрів) у різних концентраціях, та інкубують при кімнатній температурі протягом 1 год. Після промивання планшет інкубують зі 100 мікролітрами кон'югату козячого антилюдського IgG F(ab')₂-HRP (пероксидаза хрону) (Jackson Immuno Research Laboratories) при кімнатній

температурі протягом 45 хв. Планшети промивають, і потім інкубують зі 100 мікролітрами 3,3',5,5'-тетраметилбензидину. Оптичну густину при 650 нм зчитують із застосуванням мікропланшет-рідера SpectraMax®. Половинну максимальну ефективну концентрацію (EC₅₀) обчислюють із застосуванням програми GraphPad Prism 7.

5 В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 зв'язувало людський CD137 з EC₅₀ 0,027 нМ.

Антитіло A1/2 зв'язується з CD137 макак-крабоїдів

Здатність антитіл, розкритих у цьому описі, зв'язуватись з поверхневоклітинним CD137 макак-крабоїдів, може бути виміряна із застосуванням проточного цитометричного аналізу. Стабільні клітини, що експресують CD137 макак-крабоїдів, одержують трансфекцією плазмідної ДНК рецепторів CD137 макак-крабоїдів в людські клітини 293 (Американська колекція типових культур (ATCC)) із застосуванням реагенту Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) за протоколом виробника. Стабільні клітини відбирають із застосуванням 0,5 мкг/мл пуроміцину в модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла, яке містить 10 % бичачої ембріональної сироватки та 1 % GlutaMAX™. Для проточної цитометрії злиті прирослі клітини відокремлюють із застосуванням буфера для дисоціації клітин Gibco® (Life Technologies), блокують в FACS-буфері (забуферений фосфатом фізіологічний розчин, який містить 3 % бичачої ембріональної сироватки) протягом 1 год. при температурі 4 °С, після чого переносять на 96-лунковий круглодонний планшет з розрахунку 1×10⁵ клітин/лунку. Додають антитіло A1/2, BMS20H4.9, PF83 або контрольний людський IgG1 (розведений у FACS-буфері 1:4, починаючи при 0,5 мкг/мл) (100 мікролітрів), і клітини забарвлюють протягом 1 год. при температурі 4 °С.

Після промивання в FACS-буфері, додають вторинне кон'юговане з R-фікоеритрином P(ab')₂-специфічне антитіло до козячого антилюдського IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), при розведенні 1:200, і клітини інкубують при температурі 4 °С протягом 30 хв. Клітини промивають, а забарвлювання живих/мертвих клітин здійснюють із застосуванням набору LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain kit (Life Technologies) за протоколом виробника. Клітини промивають у FACS-буфері, і обробляють в скринінговій системі IntelliCyt HTFC®. Дані проточної цитометрії аналізуються із застосуванням програми FlowJo®. Співвідношення середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) обчислюють як (MFI експериментального антитіла)/(MFI контрольного IgG).

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 при концентрації 0,5 мкг/мл демонструє більш високе співвідношення MFI 153 у порівнянні з BMS20H4.9 (співвідношення MFI 0,94) та PF83 (співвідношення MFI 37).

Зв'язування антитіла A1/2 на людських клітинах підвищує експресію CD137

Здатність антитіл, розкритих у цьому описі, модулювати поверхневоклітинні рівні людського CD137 може бути визначена так, як наведено далі. Стабільні клітини, які експресують людський CD137, одержують трансфекцією плазмідної ДНК людського CD137 в людські клітини 293 (Американська колекція типових культур (ATCC)) із застосуванням реагенту Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) за протоколом виробника. Стабільні клітини відбирають із застосуванням 0,5 мкг/мл пуроміцину в модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла, яке містить 10 % бичачої ембріональної сироватки та 1 % GlutaMAX™. Антитіла проти CD137, починаючи при 300 нмоль в середовищі, інкубують з клітинами при температурі 37 °С протягом 24 год. Клітини промивають PBS, відокремлюють із застосуванням буфера для дисоціації клітин Gibco®, та забарвлюють тими самими антитілами проти CD137 у холодному буфері (1xPBS, 1 % BSA, 0,09 % азиду натрію) протягом 2 год. Після промивання клітини протягом 30 хв забарвлюють кон'югованим з Alexa Fluor 647 козячим антилюдським IgG детекційним антитілом (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Клітини промивають, і піддають диференційному міченню із застосуванням Zombie Green Live/Dead (BioLegend) за протоколом виробника. Всі клітини піддають обробці на Fortessa X-20. Аналіз проводять із застосуванням програми FlowJo® для визначення середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) Alexa Fluor 647, і відкалібровують до молекул Alexa Fluor 647 за стандартною кривою еквівалентного розчинного флюорохрому (MESF) (Bangs Laboratories). Значення MESF нормалізують відносно необроблених забарвлених контролів (100 %) та необроблених ізотипових забарвлених контролів (0 %).

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 в концентрації 300 нмоль індукує збільшення (21 %) рівнів CD137 порівняно з PF83 (12 %), тоді як BMS20H4.9 знижує CD137 на поверхні клітин на 56 %.

NF-каппаВ люциферазне репортерне дослідження активності антитіла A1/2

Здатність антитіл, розкритих у цьому описі, активувати NF-каппаВ може бути виміряна так, як наведено далі. Подвійні стабільні NF-каппаВ люциферазні репортерні/людські клітини 293, одержують трансфекцією pGL4.32 [luc2P/NF-каппаВ-RE/Hygro] плазмідної ДНК (Promega) в

клітини 293, що експресують людський CD137, із застосуванням реагенту Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies) за протоколом виробника. Стабільні клітини відбирають із застосуванням 100 мкг/мл гігроміцину та 0,5 мкг/мл пуроміцину в модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла, яке містить 10 % бичачої ембріональної сироватки та 1 % GlutaMAX™. Клітини висівають на 384-лунковий планшет з розрахунку 5×10^3 клітин/лунку, використовуючи диспенсер Thermo MultiDrop Combi Reagent Dispenser (компанія Thermo Fisher Scientific), і культивують протягом ночі при температурі 37 °C. Антитіло A1/2, BMS20H4.9, PF83 або контрольний людський IgG1 на планшеті розводять для 10-точок 2-кратними розведеннями у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS) із застосуванням Hamilton STAR™ (Hamilton Company), починаючи з 9 мкмоль або 1,33 мкмоль, і переносять на клітини. Потім клітини інкубують з антитілами протягом 5,5 год. при температурі 37 °C у 5 % CO₂, після чого обробляють із застосуванням системи кількісного аналізу люциферази ONE-Glo™ (Promega™) і диспенсера Thermo™ Scientific MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser. Люмінесценцію вимірюють із застосуванням мікропланшет-рідера SpectraMax® (Molecular Devices), а аналіз даних проводять із застосуванням Genedata Screener® (Genedata). Дані нормалізують так: % активність = [(медіана значення/лунку мінімального контролю)/(медіана максимального контролю - медіана мінімального контролю)] × 100 %.

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 продемонструвало 78 % максимальну активність, що перевищує відповідний показник для PF83 (максимальна активність 12 %), і є нижчою ніж відповідний показник для BMS20H4.9 (максимальна активність 115 %).

Антитіло A1/2 стимулює продукування Т-клітинного гамма-інтерферону Здатність розкритих у цьому описі антитіл стимулювати продукування Т-клітинного гамма-інтерферону (IFN-gamma) може бути виміряна так, як описано далі. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) людини виділяють з цільної крові або лейкопаків центрифугуванням у градієнті щільності фіколла (Ficoll® Paque PLUS; GE Healthcare), і культивують у середовищі Меморіального інституту Розуелл-Парк (RPMI) (Life Technologies) з 10 % ембріональної телячої сироватки (HyClone). Клон HIT3а антитіла проти людського CD3 (BD Biosciences) в PBS наносять на 96-лунковий планшет (типовий діапазон: від 2 нг/лунку до 15 нг/лунку), та інкубують протягом ночі при температурі 4 °C. Після відсмоктування лунки промивають PBS, і людські PBMC переносять на 96-лунковий планшет з розрахунку $1,5 \times 10^5$ клітин/лунку. Антитіла A1/2, BMS20H4.9, PF83 або контрольний людський IgG1 готують шляхом розведення 1:4 в RPMI, яке містить 10 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби, при вихідній концентрації 80 мкг/мл. На планшет наносять спочатку клон CD28.2 антитіла проти людського CD28 (BioLegend) (типовий діапазон: від 0,2 мкг/мл до 2 мкг/мл), потім досліджуване антитіло, та інкубують протягом 96 год. при температурі 37 °C у 5 % CO₂-інкубаторі. Супернатанти збирають, і рівень людського гамма-інтерферону вимірюють із застосуванням набору R&D Systems® human IFN-gamma DuoSet ELISA kit. Стисло, на планшет протягом ночі при кімнатній температурі наносять іммобілізоване антитіло (4 мкг/мл) для захоплення гамма-інтерферону (IFN-gamma). Після відсмоктування та промивання планшет блокують протягом 1 год. при кімнатній температурі. Додають супернатанти зразків та стандарт гамма-інтерферону, та інкубують протягом 2 год. при кімнатній температурі. Після промивання додають 100 мікролітрів антитіла для виявлення гамма-інтерферону, інкубують протягом 2 год. при кімнатній температурі, та промивають. Стрептавідин-HRP (100 мкл, розведення 1:40) додають протягом 20 хв при кімнатній температурі. Після промивання пластини проявляють додаванням спочатку 100 мкл субстратного розчину протягом 20 хв, потім 50 мкл розчину зупиняють реакцію, і вимірюють сигнал при 450 нм із застосуванням мікропланшет-рідера SpectraMax®. Аналіз даних проводять із застосуванням програм SoftMax Pro та GraphPad Prism (GraphPad Software). Кратність індукції обчислюють як середній вміст гамма-інтерферону проби (нг/мл)/середній вміст гамма-інтерферону контрольного hlgG1 (нг/мл).

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 підсилює субоптимальну активацію людських PBMC коstimуляцією CD3/CD28, яка вимірюється за продукуванням цитокину гамма-інтерферону. Щодо цього, то обробка антитілом A1/2 (5 мкг/мл) призводить до 3,8-кратного збільшення продукування гамма-інтерферону, що є більшим ніж відповідний показник PF83 (1,6-кратне збільшення) та меншим ніж відповідний показник BMS20H4.9 (9,4-кратне збільшення).

Аналіз зв'язування антитіла A1/2 твердофазним імуноферментним методом

Зв'язування антитіла A1/2 з людським Clq може бути виміряно із застосуванням твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Антитіло A1/2 та контрольні антитіла (негативний контрольний IgG1) послідовно розводять у PBS, та наносять на планшет ELISA

протягом ночі при температурі 4 °C. Людський Clq в казеїновому буфері додають в концентрації 10 мг/мл, і інкубують протягом 2 год. Людський Clq виявляють шляхом інкубації планшетів з HRP-кон'югованим антилюдським Clq (AbD Serotec Inc., розведення 1:200) протягом 1 год., і планшети проявляють із застосуванням TMB (KPL, Inc.). Оптичну густину при 450 нм вимірюють із застосуванням гібридного багатофункціонального рідера Synergy Neo2 (BioTek®).

Зв'язування антитіла A1/2 з FcγRI, FcγRIIa(H), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) і Fcγ (V) визначають із застосуванням аналізу MSD (Meso Scale Diagnostics). Стисло, рецептори Fcγ наносять на планшети Meso Scale протягом ночі, на планшети додають послідовно розведені досліджувані антитіла, та інкубують протягом 2 год. Антитіло A1/2 виявляють із застосуванням другого антилюдського антитіла (Meso Scale Diagnostics, D20TF-6), і планшети проявляють із застосуванням буфера зчитування T (Read Buffer T) (Meso Scale Diagnostics, R92TC-1). Люмінесценцію вимірюють із застосуванням SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Diagnostics), і дані аналізують із застосуванням програми GraphPad Prism 7.0.

Таблиця 3

Антитіло	FcγRI (EC ₅₀ нМ)	Fcγ (H) (EC ₅₀ нМ)	FcγRIIb (EC ₅₀ нМ)	FcγRIIIa(F) (EC ₅₀ нМ)	FcγRIIIa(V) (EC ₅₀ нМ)	Людський Clq (EC ₅₀ нМ)
Антитіло A1/2	>5*	>134*	>134*	>134*	>134*	>330*
Позитивний контрольний IgG1 (Ефекторні функціональні властивості інтактного Fc-рецептора)	0,8	93,7	>134*	19	6,2	8,9

* Позначає максимальну концентрацію досліджуваного антитіла

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 не зв'язувалося з FcγRI, Fcγ, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIa або Clq (як показано в наведеній вище Таблиці 3). В інших експериментах антитіло A1/2 не демонструвало виявлюваної ефекторної функції в аналізах антитілозалежної клітинної цитотоксичності та комплементзалежної цитотоксичності.

Протипухлинна ефективність антитіла A1/2 у пухлинній моделі, яка прижилася

Лінію клітин пухлини людського недрібноклітинного раку легенів HCC827 (ATCC) підтримують у відповідних середовищах та збирають для імплантації. Пухлинні клітини (1×10⁷ клітин на мишу) вводять підшкірно у правий бік мишей-самиць лінії NOD/SCID Gamma (NSG) (Jackson Laboratories) 7-тижневого віку. Коли пухлини досягають розміру приблизно від 350 мм³ до 450 мм³, мишей доволіно розподіляють на групи від 5 до 8. Розмножені людські Т-клітини одержують шляхом стимулювання наївних людських PBMC кульками Dynabeads® Human T-expander CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific) протягом 9-10 днів, і зберігають у клітинному банку. Людські PBMC (Центр переливання крові Нью-Йорку) одержують центрифугуванням через Ficoll® Paque PLUS в пробірках SepMate (STEMCELL Technologies), і зберігають у банку крові. Розмножені Т-клітини відтають, і 1×10⁶ клітин вводять мишам. Як контроль, деяким мишам окремо імплантують пухлинні клітини без Т-клітин або PBMC. Обробка починається в день 0, або в день 1. Досліджувані групи містять контрольний IgG, BMS20H4.9, PF83 та антитіло A1/2. Тваринам один раз на тиждень протягом 4 тижнів шляхом інтраперітоніальної ін'єкції вводять антитіло у дозі 10 мг/кг. Маса тіла (BW) реєструють два рази на тиждень, а зміну BW у відсотках розраховують за формулою: (BW в день спостереження - BW в початковий день)/BW в початковий день × 100 %. Об'єм пухлин вимірюють двічі на тиждень із застосуванням електронного штангенциркуля. Об'єм пухлини розраховують за формулою: Об'єм пухлини (мм³) = π/6·Довжина·Ширина². % Т/С обчислюють за формулою 100 × ΔT/ΔC, якщо за геометричними середніми значеннями ΔT>0. ΔT - середній об'єм пухлини в групі, яка одержує антитіло, в день спостереження дослідження - середній об'єм пухлини в групі, яка одержує антитіло, в початковий день дозування. ΔC = середній об'єм пухлини в контрольній групі в день спостереження дослідження - середній об'єм пухлини в контрольній групі в початковий день дозування. Статистичний аналіз даних щодо об'єму пухлин виконується із застосуванням

двофакторного дисперсійного аналізу з повторними вимірами за часом і обробкою із застосування процедур MIXED у програмі SAS (версія 9.2).

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, миші, оброблені антитілом A1/2, демонстрували значне інгібування росту пухлин (T/C% = 30,6; P<0,001) на відміну від мишей, оброблених PF83 (T/C% = 81,2) та BMS20H4.9 (T/C% = 96,9), у яких ознак інгібування не спостерігалось.

Результати дослідження кінетики/спорідненості для антитіла A1, антитіла A2 та антитіла A1/2

Для вимірювання кінетики зв'язування іммобілізованого людського CD137-Fc з антитілом A1, антитілом A2 та антитілом A1/2 може бути використаний прилад BiacoreT200. Рекombінантний людський позаклітинний білок CD137-Fc (R&D Systems) ковалентно іммобілізують на сенсорному чипі CM5 сполученням аміногруп (GE Healthcare). Випробування антитіла проти CD137 проводять зі швидкістю потоку 30 мкл/хв у буфері HBS-EP+. Зразки вводять в різних концентраціях, і вимірювання здійснюють при температурі 25 °C. Після кожного введення зразка поверхню регенерують гліцином-HCl (10 ммоль, pH 2,0) при швидкості потоку 30мкл/хв протягом 24 с з подальшою стабілізацією буфером протягом 10 с. Сенсограми концентрацій в межах від 0,123 нмоль до 30 нмоль оцінюються із застосуванням програми Biacore T200. Розрахунок констант швидкості асоціації (Ka) та дисоціації (Kd) базується на підгонці за ленгмюрівською моделлю зв'язування 1:1. Константу дисоціації у рівноважному стані (KD) або константу спорідненості зв'язування обчислюють з відношення констант кінетичної швидкості Kd/Ka.

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1, антитіло A2 і антитіло A1/2 зв'язувалися з людським CD137 з кінетикою та константами спорідненості, показаними у Таблиці 4.

Таблиця 4

Антитіло	K _{on} (1/мс)	K _{off} (l/C)	K _D (M)	R _{max}	Xi ²
Антитіло A2	1,33E+06	7,13E-03	5,36E-09	23,10	0,247
Антитіло A1	1,61E+06	5,36E-03	3,33E-09	22,76	0,355
Антитіло A1/2	1,52E+06	7,11E-03	4,67E-09	20,86	0,303

NF-каппаВ люциферазний репортерний аналіз з порівнянням антитіла A1, антитіла A2 та антитіла A1/2

Здатність антитіл, розкритих у цьому описі, активувати NF-каппаВ, може бути виміряна так, як описано раніше, з модифікацією, яка полягає в тому, що розведення антитіл готують у PBS, а 10-точкове 2-кратне розведення здійснюють на планшеті, починаючи з 9 мкмоль.

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 (максимальна активність 70,5 %) проявляло аналогічну максимальну активність порівняно з антитілом A1 (максимальна активність 63,4 %) та антитілом A2 (максимальна активність 72,3 %).

Антитіло A1 і антитіло A2 стимулюють продукування Т-клітинного гамма-інтерферону

Здатність розкритих у цьому описі антитіл стимулювати продукування Т-клітинного гамма-інтерферону (IFN-γ) може бути виміряна так, як описано раніше. В експериментах, здійснених по суті так, як описано у цьому описі, антитіло A1, антитіло A2 і антитіло A1/2 підвищують субоптимальну активацію людських PBMC коstimуляцією CD3/CD28, яка вимірюється за продукуванням цитокінів гамма-IFN. Щодо цього, то обробка антитілом A1/2 у дозі 5 мкг/мл призводила до 3,1-кратного збільшення продукування гамма-IFN, яке було порівняним з антитілом A1 (3,5-кратне збільшення) та антитілом A2 (3,5-кратне збільшення).

Протипухлинна ефективність антитіла A1 та антитіла A2 у пухлинній моделі, яка прижилася

Здатність антитіл, розкритих у цьому описі, інгібувати ріст пухлин у мишей може бути виміряна так, як описано раніше у цьому описі.

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1, антитіло A2 та антитіло A1/2 інгібували ріст пухлин у пухлинній моделі HCC827, яка прижилася. Обробка антитілом A1/2 (T/C% = 47,1 %; P<0,001) продемонструвала зниження росту пухлини, аналогічне антитілу A1 (T/C% = 56,0 %; P<0,001) та антитілу A2 (T/C% = 48,7 %; P<0,001).

Антигенна детермінанта антитіла A1, яку визначено із застосуванням рентгенівської кристалографії

Антитіло Al-Fab очищають від клітинного супернатанту 293HEK із застосуванням 12 мл CaptureSelect IgG-CHI Affinity Matrix. Для визначення чистоти та якості очищеного антитіла Al-Fab використовуються SDS-PAGE та аналітична гель-хроматографія за розміром молекул (SEC). Елюований матеріал цієї матриці піддають буферному обміну із застосуванням IX трис-

буферного сольового розчину (TBS). hCD137* (* (амінокислоти 22-161 людського CD137, Δ C121S)-AAA-6His) очищають від супернатанту 293НЕК у три етапи із застосуванням колонок Ni Sepharose® Excel, колонок Ni-NTA та колонок SEC. Стисло, два літри супернатанту завантажують безпосередньо без будь-якого буферного обміну в колонку Ni Sepharose Excel. Елюент цього етапу піддають буферному обміну із застосуванням PBS з подальшим очищенням із застосуванням гравітаційної потокової колонки Ni-NTA. Елюент цього етапу додатково очищають, і піддають буферному обміну з IX TBS із застосуванням препаративної колонки SEC. Потік з першого етапу через Ni Sepharose Excel містить значну кількість hCD137*. У подальшому він перезавантажується в колонку Ni Sepharose Excel, а потім в колонки Ni-NTA та препаративні колонки SEC. SDS-PAGE використовується для об'єднання фракцій hCD137* за їх ступенем чистоти. Концентрація hCD137* становить 14,5 мг/мл, а концентрація антитіла Al-Fab становить 7,5 мг/мл.

Комплекси антитіла Al-Fab:hCD137* об'єднують у мольному співвідношенні 1:1, після чого завантажують на гель-фільтраційну колонку, заздалегідь врівноважену трис-буфером (20ммоль, pH 8,0) і хлоридом натрію (100 ммоль). Одержаний комплекс концентрують до 12,5 мг/мл. Після фільтрації комплекс антитіла Al-Fab:hCD137 доводять до співвідношення 1:1 за умов скринінгу некомпактних матричних кристалів в розташованих на пластинах краплях із застосуванням рідинного диспенсера Phoenix, при температурі 21 °C і при температурі 8 °C. Великі призмоподібні кристали ростуть в однакових умовах протягом 4 днів в 1 М тринатрійцитратному буфері (pH 6,5) при температурі 21 °C. Кристали збирають у кріозахищеному 20 % розчином гліцерину резервуарі, який розміщений та зберігається у рідкому азоті, з подальшим рентгенологічним скринінгом зразків із застосуванням джерела синхротронного випромінювання (Advanced Photon Source) (Аргонська національна лабораторія) і збиранням даних. Дані щодо антитіла Al-Fab/hCD137* обробляються до 2,4 Å із застосуванням комплексу програм CCP4 (Winn, M.D. et al., Acta. Cryst. 2011:D67, 235-242). Кристал належить до просторової групи P3121 з параметрами комірок $a=b=124,9$ Å, $b=112,7$ Å, $\alpha=\beta=90^\circ$ і $\gamma=120^\circ$. Структура визначається шляхом молекулярної заміни із застосуванням програми Phaser (McCoey, A.J. et al., J. Appl. Cryst. 2007 40:658-674), використовуючи внутрішню структуру Fab як пошукову модель. Вирішення молекулярної заміни для Fab доопрацьовують із застосуванням Refmac (Winn, M.D. et al., Acta. Cryst. 2011:D67, 235-242; Murshudov, G.N. Act. Cryst. 2011:D67, 355-367) та Buster (Bricogne, G. et al., 2016; Buster, Версія 2.11.6, Кембридж, Великобританія: Global Phasing Ltd.). Карти уточнення використовуються для ручної побудови в моделі для CD137 із застосуванням програми COOT (Emsley, P. Acta Cryst. 2010:D66, 486-501). Уточнені R-коефіцієнти дорівнюють: $R=17,8\%$, $R_{free}=20,5\%$.

В експериментах, здійснених по суті так, як описано в цьому дослідженні, комплекс антитіла Al-Fab:hCD137* розкладається, і антигенна детермінанта/паратоп показані в наведеній нижче Таблиці 5. У Таблиці 5 перелічені залишки антитіла Al-Fab, які знаходяться в межах 6 Å від перелічених залишків hCD137*. Важкий ланцюг антитіла Al-Fab має 57 контактів (межа пропускання 6 Å) з hCD137*, тоді як легкий ланцюг має 18 контактів (межа пропускання 6 Å).

Таблиця 5

Людський CD137 (Антигенна детермінанта)	Антитіло A1 Важкий ланцюг (Паратоп)	Антитіло A1 Легкий ланцюг (Паратоп)
S55	Q62	-
Q59	Q62	-
D63	Q62	-
R66	F55	-
F72	F55	-
H93	T103	-
C94	T102, T103, A104, P105	-
L95	M101, T102, T103, P105, G106, T107	-
G96	L100, M101, T102, T103, P105, G106, T107	G92, N93
A97	M101, T102, P105, G106, T107	G92, N93, S94, F95, L97
G98	P105	G92, N93, S94, F95
C99	P105	-
S100	I52, F55, N59, M101, P105, T107	F95
M101	S31, I52, I54, F55, M101	-
C102	F55	-

Таблиця 5

Людський CD137 (Антигенна детермінанта)	Антитіло A1 Важкий ланцюг (Паратоп)	Антитіло A1 Легкий ланцюг (Паратоп)
E103	T103	-
L112	T103	-
T113	T103	-
K114	M101, T102, T103, A104	D51, D54
K115	L100, M101, T102, T103, D110	F50, E56, T57
G116	M101, T102, T103	F50

Антитіло A1/2 повністю блокує взаємодії CD137/ліганда CD137

Здатність антитіл, розкритих у цьому описі, блокувати взаємодії людського CD137 і ліганда CD137 (надалі, CD137L), може бути виміряна із застосуванням твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). По-перше, аналіз ELISA використовується для кількісного визначення EC_{50} зв'язування hCD137** (амінокислоти людського CD137 22-164, Δ C121S)-AAA-FLAG з hCD137L* та антитілом A1/2, BMS20H4.9 та PF83. Лунки 96-лункового планшета Immulon® 4HBX ELISA сенсibiliзують протягом ночі 50 нг hCD137** в 100 мкл PBS, pH 7,2, зі слабким перемішуванням при температурі 4 °C. Після блокування 5 % BSA у PBST та промивання кожне розведення з послідовності 5-кратних розведень (392 нмоль - 0,005 нмоль) His-міченого рекомбінантного людського CD137L (надалі, hCD137L*) (R&D Systems), (53-0,00068 нмоль) BMS20H4.9, (107-0,0014 нмоль) PF83 або (53-0,00068 нмоль) антитіла A1/2 додають з подвоєнням, і інкубують зі слабким перемішуванням протягом 1 год. при кімнатній температурі. Далі лунки, оброблені антитілами проти CD137, промивають, додають 1:10000 розведення HRP-кон'югованого козячого анти-Fab антитіла (Jackson ImmunoResearch Laboratories), і планшети інкубують при кімнатній температурі за стандартним протоколом. Далі лунки, оброблені hCD137L*, промивають, додають 1:5000 розведення HRP-кон'югованого мишачого анти-His антитіла (Sigma-Aldrich®), і планшети інкубують при кімнатній температурі за стандартним протоколом. Хромогенний субстрат TMB-пероксидаза та розчин для зупинення реакції застосовують згідно інструкції виробника для візуалізації та виявлення сигналів. Показання оптичної густини наносять на графік, виконаний у програмі GraphPad Prism Version 6. Значення EC_{50} обчислюють із застосуванням аналізу шляхом підгонки нелінійної регресійної кривої, одержаної із застосуванням програмної функції визначення специфічного моносайтового зв'язування. В експериментах, здійснених по суті так, як описано, афінність зв'язування (EC_{50}) з hCD137** визначалася на рівні 0,6 нмоль для hCD137L, 1,4 нмоль для антитіла 1/2, 0,43 нмоль для BMS20H4.9 і більше 10 нмоль для PF83.

Здатність hCD137L* конкурувати з BMS20H4.9, PF83 та антитілом A1/2 за зв'язування з hCD137** може бути визначена так. Лунки 96-лункового планшета Immulon 4HBX ELISA сенсibiliзують протягом ночі 50 нг hCD137** в 100 мл PBS, pH 7,2, зі слабким перемішуванням при температурі 4 °C. Після блокування (5 % BSA у PBST) та промивання 5-кратне розведення (від 196 нмоль до 0,0025 нмоль) hCD137L*) змішують з насичувальними кількостями визначеного антитіла: антитіло A1/2 (200 нг/лунку), BMS20H4.9 (3 нг/лунку) або PF83 (1000 нг/лунку). Далі суміші з подвоєнням додають в лунки, та інкубують зі слабким перемішуванням протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання планшет інкубують з HRP-кон'югованим козячим анти-Fab антитілом (розведення 1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) при кімнатній температурі за стандартним протоколом. Хромогенний субстрат TMB-пероксидаза та розчин для зупинення реакції застосовують згідно інструкції виробника для візуалізації та виявлення сигналів.

Відсоток mAb, яке залишається зв'язаним з CD137, наносять на графік, а значення IC_{50} обчислюють із застосуванням аналізу шляхом підгонки нелінійної регресійної кривої, застосовуючи програму GraphPad Prism.

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, hCD137L* повністю блокував зв'язування Антитіла A1/2 з hCD137** з IC_{50} 0,401 нмоль. hCD137L* також блокував зв'язування PF83 з hCD137** з IC_{50} 1,037 нмоль (30 % сигнал зв'язування залишається на поверхні). Вплив hCD137L* на зв'язування BMS20H4.9 з hCD137** був таким, що його не можливо виміряти.

Антитіло A1/2 зв'язує людський CD137 на конкретних амінокислотних залишках, які відрізняються від залишків, зв'язуваних BMS20H4.9 та PF83

В людський CD137 вводять точкові мутації для визначення амінокислотних залишків, на яких антитіло A1/2, BMS20H4.9 і PF83 зв'язуються з людським CD137. Мутанти CD137-Fc

одержують із застосуванням стандартного протоколу наявного у продажу набору для сайт-спрямованого мутагенезу (Quickchange II kit, Qiagen). Білки дикого типу і мутанти CD137-FC експресують та очищають. Усі мутанти, про які повідомляється у цьому описі, мають профіль виключення за розміром, подібний до профілю CD137-FC дикого типу (тобто введені мутації не порушують структурної цілісності білка). Для визначення впливу мутації на зв'язування антитіл вдаються до точкового кількісного аналізу ELISA проти CD137-FC дикого типу та мутантів. Лунки 96-лункового планшета Immulon® 4HBX ELISA сенсibiliзують протягом ночі 50 нг людського CD137-ECD-C121S-FC або його мутантів в 100 мкл PBS, pH 7,2, зі слабким перемішуванням при температурі 4 °C. Після блокування (5 % BSA у PBST) та промивання додають восьмиточкову послідовність 5-кратних розведень (100-0,00128 нмоль) визначеного антитіла, та інкубують зі слабким перемішуванням протягом 1 год. при кімнатній температурі. Лунки промивають, додають HRP-кон'юговане друге антитіло (1:10000 розведення козячого анти-Fab антитіла (Jackson ImmunoResearch Laboratories)), та інкубують при кімнатній температурі за стандартним протоколом. Хромогенний субстрат з TMB-пероксидази та розчин для зупинення реакції застосовують згідно інструкції виробника для візуалізації та виявлення сигналів. Показання оптичної густини для кожної концентраційної точки нормалізують відносно оптичної густини взаємодії дикого типу. Для кожного мутанта визначається середнє нормалізоване співвідношення для восьми концентрацій.

Мутації в людський CD137 (SEQ ID NO: 1) вводили окремо у положеннях: P27, N42, D63, Q67, A97, G98, S100, M101, Q104, K114, K115, R130, I132, R134. Таблиця 6 демонструє профілі зв'язування BMS20H4.9 та антитіла A1/2 для показаних мутантів людського CD137. Таблиця 7 демонструє профілі зв'язування PF83 та антитіла A1/2 для показаних мутантів людського CD137. У сукупності, Таблиця 6 і Таблиця 7 демонструють, що антитіло A1/2 зв'язується з амінокислотними залишками на людському CD137, які відрізняються порівняно з BMS20H4.9 та PF-83.

Таблиця 6

	BMS20H4.9 (% зв'язування відносно hCD137 дикого типу)	Антитіло A1/2 (% зв'язування відносно hCD137 дикого типу)
P27L*	85	100
N42S*	0	100
D63N	100	100
Q67R	100	100
Q67V	100	100
A97P	100	15
G98K	100	85
G98Q	100	100
S100T	100	100
M101R	100	100
Q104K	100	100
K114E	100	20
K115Q	100	25

* Визначає положення, які знаходяться за межами антигенної детермінанти антитіла A1/2, як визначено рентгенівською кристалографією при 6Å

Таблиця 7

	Антитіло A1/2 (% зв'язування відносно hCD137 дикого типу)	PF83 (% зв'язування відносно hCD137 дикого типу)
K115Q	25	100
R130A*	100	100
R130H*	100	100
I132V*	100	100
R134Q*	100	25

* Визначає положення, які знаходяться за межами антигенної детермінанти антитіла A1/2, як визначено рентгенівською кристалографією при 6Å

Експресія гена CD137 в пухлинах людини

Профіль експресії гена CD137 в імунних інфільтратах пухлин людини може бути досліджений із застосуванням бази даних Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA) та обчислювальної методології. Стисло, співвідношення експресії CD137/CD3e визначають за результатами лікування з бази даних Omicsoft, що включає в себе TCGA RNASeq (послідовності РНК з Атласу ракового генома). Для порівняння співвідношень експресії CD137/CD3e у зразках пухлини та у зразках тієї самої нормальної тканини, яка є прилеглою до пухлини, застосовують t-критерій Стюдента, і для кожного типу пухлин розраховують d Кохена. Типи пухлин, які мають значення $P < 0,05$ за t-критерієм експресії пухлини проти нормального зразка та великий розмір ефекту d Кохена $d > 0,8$, є статистично значущими. Різниця у співвідношенні експресії CD137/CD3e в пухлині порівняно з нормальною тканиною обчислюється як log fold change (logFC)(log кратності змінення).

В експериментах, здійснених по суті так, як описано, в різних типах ракових пухлин спостерігали підвищене співвідношення CD137/CD3 в пухлинах, в тому числі але без обмеження ними, пухлини молочної залози, ободової кишки, ендометрію, сечового міхура і голови та шиї (Таблиця 8). Пухлини, збагачені CD137⁺ лімфоцитами, є кандидатами для терапії антитілами проти CD137 із застосуванням антитіла A1, антитіла A2 або антитіла A1/2.

Таблиця 8

Рак	Співвідношення експресії CD137/CD3 (logFC)	P-значення
Сечового міхура	1,92	3,85E-03
Молочної залози	2,46	3,56E-39
Холангіокарцинома	1,78	4,81E-06
Ободової кишки	2,36	1,23E-19
Ендометрію	2,14	4,01E-15
Стравоходу	1,07	1,71E-04
Шлунка	1,68	9,27E-10
Голови та шиї	1,90	8,06E-15
Аденокарцинома легенів	1,37	2,63E-13
Плоскоклітинний рак легенів	1,63	2,37E-13
Передміхурової залози	1,04	2,73E-04
Прямої кишки	1,62	1,40E-05
Щитовидної залози	1,24	2,29E-06

Антитіло A1/2 посилює пухлинну інфільтрацію CD3⁺ Т-клітин in vivo

Здатність антитіл, розкритих в цьому описі, змінювати пухлинну інфільтрацію Т-клітин в гуманізованих мишачих моделях може бути визначена імуногістохімічним (IHC) шляхом. Стисло, мишам лінії NSG імплантують клітини людського недрібноклітинного раку легенів L55 (L55-CBG-2A-GFP, Університет штату Пенсільванія). Після досягнення пухлинами розміру 250-300 мм³, мишам впорскують людські РВМС (8×10^6 клітин), і один раз на тиждень протягом 4 тижнів вводять антитіла у дозі 10 мг/кг. Наприкінці дослідження пухлини збирають у формалін, заливають парафіном, готують зрізи та забарвлюють антитілом проти CD3 (Cell Signaling Technology). Зображення з 200X збільшенням одержують із застосуванням Aperio XT ScanScore®, і піддають напівкількістному аналізу. Із застосуванням програми Aperio ImageScore обчислюють відсоток CD3 позитивних клітин від загальної кількості пухлинних клітин. Результати порівнюють із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим застосуванням методу Холма-Шідака для множинних порівнянь (Sigma Plot 12.5, Systat Software).

В експериментах, здійснених по суті так, як описано вище, антитіло A1/2 індувало пухлинну інфільтрацію CD3⁺ Т-клітин у встановлені пухлини L55. Відсоток CD3 Т-клітин у відповідь на антитіло A1/2 (60 %) є більш високим, порівняно з обробкою BMS20H4.9 (18 %) або людським IgG (27 %).

Амінокислотні та нуклеотидні послідовності

SEQ ID NO: 1 (людський CD137)

5 MGNSCYNIVATLLLVNLFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDIC
 RQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQK
 RGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTST
 ALLFLLFFLTFRFSWKRGKRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 2 (HCDR1)

KASGGTFSSYAIS

SEQ ID NO: 3 (HCDR2)

GIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3)

ARLMTTAPGTYFDL

SEQ ID NO: 5 (LCDR1)

QASQDIGNSLG

SEQ ID NO: 6 FDASDLET (LCDR2)

SEQ ID NO: 7 QQGNSFPLT (LCDR3)

SEQ ID NO: 8 (HCVR)

10

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGGIPIFGTANYAQKF
 QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLMTTAPGTYFDLWGRGTL VTV

SEQ ID NO: 9 (LCVR антитіла A1)

15

AIRMTQSPPSLASVGDRVTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGS
 GSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTREIK

SEQ ID NO: 10 (HC)

20

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGGHPIFGTANYAQKF
 QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLMTTAPGTYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSDKHTHTCPPEAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 25 WDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (LC антитіла A1)

30

AIRMTQSPPSLASVGDRVTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGS
 GSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWC
 LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

35

SEQ ID NO: 12 (LCVR антитіла A2)

IRMTQSPPSLASVGDRVTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGSG
 SGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL

40

SEQ ID NO: 13 (LC антитіла A2)

IRMTQSPPSLASVGDRVTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGSG
 SGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
 LNNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
 45 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14 (ДНК важкого ланцюга)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCT
 CCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTG
 GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAA
 GTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG
 5 CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTGATGACTACGGCCCT
 GGGACGTA CTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG
 GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
 GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCACTGA
 CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
 10 GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAC
 CGTGCCCGCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAG
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 15 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAAGA
 CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCATCCTCCATCGAG
 AAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
 GGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
 CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGT
 20 GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAATGA

SEQ ID NO: 15 (ДНК легкого ланцюга антитіла A1)

25 ATGAGGCTGCTGCCTCTGCTGGCCCTCCTGGCCCTGTGGGGCCCAGACCCAGCCAGAGCC
 GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA
 CTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGC
 CCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGC
 30 AGTGGATCTGGCACAGATTTTCAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTA
 CTATTGTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAA
 CGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAA
 GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
 CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
 35 TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
 GAGTGTTAG

SEQ ID NO: 16 (ДНК легкого ланцюга антитіла A2)

40 ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGCTCCACCGGCAT
 CCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 CAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
 AACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATCTGGCACAGATTTTCAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTATT
 45 GTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAAC
 TGTGGCCGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT
 CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAC
 GCCCTCCAATCGGGTAACCTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
 AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG
 50 AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 17 (ДНК легкого ланцюга антитіла A1 /2)

55 ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGCTCCACCGGCG
 CCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC
 TTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CTAACCTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCA
 GTGGATCTGGCACAGATTTTCAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTAC
 TATTGTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAC
 60 GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC

GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA
CCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
TTAG

5

SEQ ID NO: 18 (важкий ланцюг BMS20H4.9)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLE
SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGT
KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

15

SEQ ID NO: 19 (легкий ланцюг BMS20H4.9)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
WCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

SEQ ID NO: 20 (важкий ланцюг PF83)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYS
FQGQVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPC
SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTY
TCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS
KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEMETDTLLWVLLWV
PGSTGAIRMTQSPPSLSASVGDRTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRF
SGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQLLSSPVTKSFNRGECNNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25

30

35

SEQ ID NO: 21 (легкий ланцюг PF83)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGLAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK
ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

40

45

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ
<110> Елі Ліллі енд Компані

<120> Антитіла проти CD137

50

<130> X21288

<160> 21

55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

60

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	1	5	10	15
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	20	25	30	
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val	35	40	45	
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp	50	55	60	
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	65	70	75	80
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	85	90	95	
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	100	105	110	
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	115	120	125	
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	130	135	140	
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	145	150	155	160
Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	165	170	175	
Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	180	185	190	
Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	195	200	205	
Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	210	215	220	
Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu									225	230		

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 2

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

10 <400> 3

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

20 <400> 4

Ala Arg Asp Leu Met Thr Thr Ala Pro Gly Thr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Штучна послідовність

<220>

30 <223> Синтетична конструкція

<400> 5

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser Leu Gly
1 5 10

35

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

40 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

45 <400> 6

Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr
1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 7
 10
 Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 15
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 20
 <400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Met Thr Thr Ala Pro Gly Thr Tyr Phe Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120
 25
 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> Sythetic Construct
 <400> 9
 35

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

<210> 10

<211> 452

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 10

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

Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	130	135	140
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	225	230	235
Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	260	265	270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	290	295	300
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	325	330	335

```

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
      340      345      350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
      355      360      365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
      370      375      380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385      390      395      400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
      405      410      415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
      420      425      430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
      435      440      445
Ser Pro Gly Lys
      450

```

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 11

[illegible]

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Синтетична конструкція

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 213

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 13

```

Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
1           5           10           15
Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser Leu
          20           25           30
Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Val Ile Phe
          35           40           45
Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65           70           75           80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu Thr
          85           90           95
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
          100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
          115          120          125

```

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 14

<211> 1359

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 14

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggctctc ggtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggccttgagt gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaactac 180
 gcacagaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggagc aatccaggag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 atgaactacg cccctgggac gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 360
 tcttcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctct caagagcacc 420
 tctgggggca cagcggccct ggcctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc actgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtctacag 540
 tcttcaggac tctactcctt cagcagcgtg gtgaaccgtc cctccaggag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcctaccgt gccagcacc tgaagccgag 720
 ggggcacggt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccg 780
 accctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagacccctga ggtcaagttc 840

```

aactggtatg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagcccgog ggaggagcaq      900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccaaga ctggctgaat      960
ggcaaggagt acaagtgcas ggtctccaac aaagccctcc catcctccat cagaaaaacc      1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg      1080
gaggagatga ccaagaacca agtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccago      1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct      1200
cccgctgctgg actccgacgg ctccctcttc ctctattcca agctcacctg ggacaagagc      1260
aggtggcagc aggggaaact cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac      1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggcaaatga      1359

```

5
 <210> 15
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

10
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 15

```

atgaggctgc tgcctctgct ggcctctctg gccctgtggg gccagagccc agccagagcc      60
gccatccgga tgacccagtc tccaccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      120
atcaattggc aggcgagtcg ggacattggc aactctttag gttggtatca gcagaaacca      180
gggaaagccc ctaaaactcg gatcttcgat gcacagatc tggaaacagg ggtcccatac      240
aggttcagtg gcagtggatc tggcacagat ttcagtctca coactcagcag cctgcagcct      300
gaggattttg caacttacta ttgtcaacag ggtaacagtt tcccgctcac cttgggocaa      360
gggacacgac tggagattaa acgaactgcc tcgtgtgtgt gctgctgaa taactcttat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggty gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gccacagcag caccctgacg      540
ctgagcaaaq cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gogaagtcac ccacagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcacc aggggagagt gttag      645

```

15
 <210> 16
 <211> 702
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

20
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 16

25

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ctccaccggc      60
atccggatga cccagtcctc accctccctg tctgcctctg taggagacag agtcaccatc      120
acttgccagg cgagtcagga cattggcaac tottttaggtt ggtatcagca gaaaaccaggg      180
aaagccccta aactcgtgat cttegatgca tcagatctgg aaacaggggt cccatcaagg      240
ttcagtgcca gtggatctgg cacagatttc agtctcacca tcagcagcct gcagcctgag      300
gattttgcaa cttaactattg tcaacagggg aacagtttcc cgtcacctt cggccaaggg      360
acacgactgg agattaaaag aactgtggcc gcaccatctg tcttcattct cccgcatatc      420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgotgaataa ctctctatcc      480
agagaggcca aagtcacgtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtta cccccaggag      540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc aactacagcc tcagcagcac cctgacgctg      600
agcaaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg      660
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag                                702

```

5
 <210> 17
 <211> 705
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

10
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 17

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ctccaccggc      60
gccatccgga tgaccagtc tcacacctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      120
atcaattgcc aggcgagcca ggacattggc aactctttag gttggtatca gcagaaacca      180
gggaaagccc ctaaaactgt gatcttcgat gcctcagatc tggaaacagg ggtcccatca      240
aggttcagtg gcagtggtac tggcacagat ttcagtctca ccctcagcag cctgcagcct      300
gaggattttg caacttacta ttgtcaacag ggtaacagtt tcccgtcac cttcggccaa      360
gggacacgac tggagattaa acgaaetgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctcccgcca      420
tcrgatgagc agttgaatc tggaaatgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taactcttat      480
cccagagagg ccaaaagtaca gtggaaggta gataacgcc tcaatcggg taactcccag      540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      600
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctc gcgaagtca ccatcagggc      660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                                705

```

15
 <210> 18
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 20
 <220>

<223> Синтетична

<400> 18

5

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	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	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Glu	Ile	Asn	His	Gly	Gly	Tyr	Val	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Glu	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	Asp	Tyr	Gly	Pro	Gly	Asn	Tyr	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	100	105	110	
Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	130	135	140	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	

Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly
	210				215						220				
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290				295						300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 19

5 <211> 216

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Синтетична

<400> 19

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 Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 20
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> Синтетична
 <400> 20

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

15

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

Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
				325					330					335	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
			340					345					350		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
		355					360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		370				375					380				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385					390					395					400
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				405					410					415	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			420					425				430			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
		435					440								

<210> 21

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

10

<400> 21

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln	1	5	10	15
Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Asp	Gln	Tyr	Ala	20	25	30	
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	35	40	45	
Gln	Asp	Lys	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	50	55	60	
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met	65	70	75	80
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Tyr	Thr	Gly	Phe	Gly	Ser	Leu	85	90	95	
Ala	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	100	105	110	
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	115	120	125	
Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	130	135	140	
Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	165	170	175	
Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	180	185	190	
Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	195	200	205	
Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser											210			

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло проти людського CD137, що включає: HCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, HCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, HCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6, і LCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.
2. Антитіло за п. 1, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9.
3. Антитіло за п. 1, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.
4. Антитіло за п. 1, що включає важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.
5. Антитіло за п. 1, що включає важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13.
6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5 для застосування в терапії.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5 для застосування в лікуванні раку.
8. Антитіло за п. 7, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.
9. Антитіло за п. 7, де згаданий рак - це холангіокарцинома, плоскоклітинний рак голови та шиї, аденокарцинома легенів, плоскоклітинний рак легенів або світлоклітинний рак нирки.
10. Антитіло за п. 7, де згаданий рак - це рак сечового міхура, плоскоклітинний рак голови та шиї або нирковоклітинний рак.
11. Антитіло за будь-яким з пп. 7-10 для застосування шляхом введення одночасно, окремо або послідовно в комбінації з іонізуючим випроміненням.
12. Антитіло за будь-яким з пп. 7-11 для застосування шляхом введення одночасно, окремо або послідовно в комбінації з одним або декількома хіміотерапевтичними засобами.
13. Клітина ссавця, здатна експресувати антитіло проти людського CD137, що включає HCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, HCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, HCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6, і LCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.
14. Клітина ссавця за п. 13, здатна експресувати антитіло, що включає важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 або амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13.
15. Спосіб продукування антитіла проти людського CD137, який включає культивування клітини ссавця, здатної експресувати зазначене антитіло, та виділення антитіла; де згадане антитіло включає HCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, HCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, HCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR1, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR2, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6, і LCDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.
16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що згадане антитіло включає важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 або амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13.
17. Антитіло, продуковане способом за будь-яким з пп. 15 та 16.
18. Антитіло за п. 17 для застосування в терапії.
19. Антитіло за п. 17 для застосування в лікуванні раку.
20. Антитіло за п. 19, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.
21. Антитіло за п. 19, де згаданий рак - це холангіокарцинома, плоскоклітинний рак голови та шиї, аденокарцинома легенів, плоскоклітинний рак легенів або світлоклітинний рак нирки.
22. Антитіло за п. 19, де згаданий рак - це рак сечового міхура, плоскоклітинний рак голови та шиї або нирковоклітинний рак.

23. Антитіло за будь-яким з пп. 19-22 для застосування шляхом введення одночасно, окремо або послідовно в комбінації з іонізуючим випроміненням.
24. Антитіло за будь-яким з пп. 19-23 для застосування шляхом введення одночасно, окремо або послідовно в комбінації з одним або декількома хіміотерапевтичними засобами.
- 5 25. Молекула ДНК, що включає полінуклеотид, що має послідовність SEQ ID NO: 14, і одну з послідовностей SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 17.
26. Клітина ссавця, що містить молекулу ДНК за п. 25.
27. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-5 та 17, та прийнятні носій, розріджувач або допоміжну речовину.
- 10 28. Спосіб лікування раку, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості антитіла за будь-яким з пп. 1-5 і 17.
29. Спосіб за п. 28, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак
- 15 щитовидної залози.
30. Спосіб за п. 28, де згаданий рак - це холангіокарцинома, плоскоклітинний рак голови та шиї, аденокарцинома легенів, плоскоклітинний рак легенів або світлоклітинний рак нирки.
31. Спосіб за п. 28, де згаданий рак - це рак сечового міхура, плоскоклітинний рак голови та шиї або нирковоклітинний рак.
- 20 32. Спосіб за будь-яким з пп. 28-31, де згадане антитіло вводять в комбінації з іонізуючим випроміненням.
33. Спосіб за будь-яким з пп. 28-32, де згадане антитіло вводять в комбінації з одним або декількома хіміотерапевтичними засобами.
34. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-5 і 17 для виготовлення лікарського засобу для
- 25 лікування раку.
35. Застосування за п. 34, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, рак жовчовивідних шляхів, рак ободової кишки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак шлунка, рак голови та шиї, недрібноклітинний рак легенів, рак простати, рак прямої кишки або рак щитовидної залози.
- 30 36. Застосування за п. 34, де згаданий рак - це холангіокарцинома, плоскоклітинний рак голови та шиї, аденокарцинома легенів, плоскоклітинний рак легенів або світлоклітинний рак нирки.
37. Застосування за п. 34, де згаданий рак - це рак сечового міхура, плоскоклітинний рак голови та шиї або нирковоклітинний рак.
38. Застосування за будь-яким з пп. 34-37, де антитіло вводять одночасно, окремо або
- 35 послідовно в комбінації з іонізуючим випроміненням.
39. Застосування за будь-яким з пп. 34-38, де антитіло вводять одночасно, окремо або послідовно в комбінації з одним або декількома хіміотерапевтичними засобами.