РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 569 187**(13) **C2**

(51) МПК
C40B 40/10 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C40B 50/06 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011147741/10, 29.05.2010**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.05.2010

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
29.05.2009 US 61/182,350;
15.06.2009 EP 09162724.0;
29.01.2010 US 61/299,401

(43) Дата публикации заявки: **10.07.2013** Бюл. № **19**

(45) Опубликовано: **20.11.2015** Бюл. № **32**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **KNAPPIK A. et al., "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides", Journal of molecular biology, 2000, 296(1): 57-86. CHEN W. et al. "Construction of a large phage-displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly** (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **29.12.2011**

(86) Заявка PCT:
EP 2010/057507 (29.05.2010)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2010/136598 (02.12.2010)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):
ЭНЦЕЛЬБЕРГЕР Маркус (DE),
ПРАССЛЕР Йозеф (DE),
УРЛИНГЕР Штефани (DE),
ГЕРМАН Таня (DE),
ТИЛЛЕР Томас (DE)

(73) Патентообладатель(и):
МорфоСис АГ (DE)

(54) КОЛЛЕКЦИЯ И СПОСОБЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложена коллекция антител (или их функциональных фрагментов), содержащих эмбриональные каркасные участки. Кроме того, рассмотрены коллекции нуклеиновых кислот, экспрессирующих векторов и рекомбинантных клеток-хозяев, а также способ получения коллекции антител по изобретению. Данное изобретение позволяет определить пары классов VH и VL в иммунном репертуаре человека для коллекции антител по изобретению, которые являются наиболее распространенными и имеют предпочтительные биофизические свойства. Предложенное решение может найти дальнейшее применение в скрининге терапевтических антител. 5 н. и 42 з.п. ф-лы, 61 ил., 32 табл., 8 пр.

RU 2569187 C2

RU 2569187 C2

(56) (продолжение):
soluble, stable heavy chain variable domain", Journal of molecular biology, 2008, 382(3): 779-789. WO 2004/108889 A2, 16.12.2004. WO 2006/014498 A2, 09.02.2006. LEE C.V. et al., "High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold." Journal of molecular biology, 2004, 340(5): 1073-1093. WO 99/20749 A1, 29.04.1999. EWERT S. et al. "Biophysical properties of human antibody variable domains", Journal of molecular biology, 2003, 325(3): 531-553. RU 2007/117144 A, 20.11.2008.

RU 2569187 C2

RU 2569187 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 569 187**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
C40B 40/10 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C40B 50/06 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011147741/10, 29.05.2010**

(24) Effective date for property rights:
29.05.2010

Priority:
(30) Convention priority:
29.05.2009 US 61/182,350;
15.06.2009 EP 09162724.0;
29.01.2010 US 61/299,401

(43) Application published: **10.07.2013** Bull. № **19**

(45) Date of publication: **20.11.2015** Bull. № **32**

(85) Commencement of national phase: **29.12.2011**

(86) PCT application:
EP 2010/057507 (29.05.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/136598 (02.12.2010)

Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):
ENGELBERGER Markus (DE),
PRASSLER Josef (DE),
URLINGER Stefanie (DE),
HERRMANN Tanja (DE),
TILLER Thomas (DE)

(73) Proprietor(s):
MorphoSys AG (DE)

(54) COLLECTION AND METHODS OF ITS APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: claimed invention relates to field of immunology. Collection of antibodies (or their functional fragments), which contain embryonic framework regions, is claimed. In addition, collections of nucleic acids, expressing vectors and recombinant host cells, as well as method of obtaining collection of antibodies by invention are disclosed. Proposed solution can find further application in screening of therapeutic antibodies.

EFFECT: invention makes it possible to determine pairs of VH and VL classes in human immune repertoire for collection of antibodies by invention, which are the most common and have preferable biophysical properties.

47 cl, 61 dwg, 32 tbl, 8 ex

RU 2569187 C2

RU 2569187 C2

В данной заявке заявлен приоритет согласно США предварительной заявке, серийный номер 61/299401, поданной 29 января 2010 г. и США предварительной заявке, серийный номер 61/182350, поданной 29 мая 2009 г., которые включены в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Достижения в разработке фармацевтических средств, особенно в области терапевтических антител, быстро обеспечивают и/или улучшают лечение многих заболеваний. Эти достижения, благодаря охвату новых целевых областей и обеспечения новых механизмов действия, приводят к значительному улучшению качества жизни пациентов даже с самыми тяжелыми и сложными заболеваниями. Одна из проблем для системы здравоохранения, s целом, и пациентов, в частности, заключается в том, что стоимость новых лекарственных средств, обеспечиваемых этими фармацевтическими достижениями, также быстро увеличивается. Высокая стоимость является результатом капиталовложений, необходимых для разработки фармацевтических средств, особенно антител, которые в настоящее время превышают один биллион долларов на рыночный продукт. Высокий риск неудачи при разработке и очень продолжительные сроки разработки делают эти вложения неизбежными. С момента идентификации потенциального терапевтического антитела и до тех пор, когда оно достигнет рынка и сможет приносить пользу пациентам, может пройти более пятнадцати лет. Каждая стадия разработки от идентификации, доклинической, клинической до выхода на рынок пестрит проблемами и рисками. Фармацевтические компании постоянно оценивают, как уменьшить стоимость разработки путем снижения сроков и рисков неудачи для того, чтобы быстро предложить пациентам наиболее эффективные лекарственные средства и для того, чтобы сделать их более доступными.

В следующем описании представлено важное достижение, которое позволяет быстрее идентифицировать оптимальные терапевтические антитела для лечения, возможно, любого заболевания. Терапевтические антитела-кандидаты должны удовлетворять целому ряду критериев разработки для продвижения на рынок, таких как долговременная стабильность и высокие выходы экспрессии. Описанное достижение увеличивает вероятность и скорость идентификации антитела, которое может удовлетворять всем строгим критериям разработки с самого начала. Полученное в результате антитело будет менее дорогостоящим при производстве и будет эффективным и безопасным при лечении многочисленных заболеваний.

Хорошо известный способ идентификации терапевтических антител осуществляется посредством применения технологии фагового дисплея. В фаговом дисплее используют вирусоподобные частицы, которые выращивают в бактериях для экпонирования антител. Одно из преимуществ этой технологии заключается в том, что используемые библиотеки являются огромными, вплоть до 1×10^{10} антител, которые можно быстро протестировать на связывание с любой мишенью, связанной с любым заболеванием. См., например, Knappik et al., (2000), "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides", J. Mol. Biol. 11; 296(1):57-86. Преимущество работы с такими большими количествами заключается в том, что результат скрининга против мишени может выявить сотни антител, которые связываются с терапевтической мишенью и которые все могут быть терапевтически значимыми. Проблема, однако, заключается в том, что часто только несколько из этих антител можно разрабатывать, что означает, что они могут удовлетворять всем строгим критериям, требующимся для продвижения на рынок.

Для того чтобы для новой фаговой дисплейной библиотеки быстро сократить сроки

идентификации и уменьшить неотъемлемые риски, данная библиотека должна содержать антитела, имеющие свойства, которые необходимы для селекции и клинической разработки и которые приводят к безопасному и эффективному лечению пациентов. Такие свойства включают: 1) высокие уровни фагового дисплея, с тем чтобы все без исключения антитела коллекции можно было протестировать против мишени, представляющей интерес; 2) высокие уровни экспрессии, обеспечивающие эффективное воспроизводство антитела или фрагмента; 3) высокую термостабильность, с тем чтобы антитело могло достичь пациента в эффективной форме; 4) высокую стабильность в сыворотке, с тем чтобы антитело могло сохраняться в организме в течение терапевтически значимого времени; 5) низкий риск иммуногенности, увеличивающей тем самым безопасность, и 5) высокое разнообразие, с тем чтобы одну библиотеку можно было использовать для идентификации антител против любой терапевтической мишени.

Библиотека, которая по существу имитирует человеческую иммунную систему, должна представлять собой чрезвычайно полезное или даже оптимальное решение. Человеческая иммунная система состоит из антител, кодируемых генами эмбрионального типа. Антитела, в частности, содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Имеются приблизительно 50 генов вариабельных областей тяжелых цепей эмбрионального типа и приблизительно 50 генов вариабельных областей легких цепей эмбрионального типа, которые при объединении обеспечивают создание примерно 2500 комбинаций пар различных вариабельных областей тяжелых и легких цепей. Считают, что у людей продуцируются все 2500 этих комбинаций. Однако обнаружили, что некоторые вариабельные области тяжелых цепей, вариабельные области легких цепей и/или комбинации (пары) вариабельных областей тяжелых и легких цепей экспрессируются на более высоком уровне, чем другие. Было высказано предположение, что должна быть причина, почему некоторые цепи экспрессируются больше, чем другие, и если это так, то высоко экспрессируемые гены эмбрионального типа могут обладать благоприятными функциональными свойствами. Поэтому один из путей получения библиотеки антител, имеющих благоприятные функциональные свойства, заключается в создании библиотеки, содержащей избыток вариабельных областей тяжелых цепей, вариабельных областей легких цепей и/или пар вариабельных областей тяжелых цепей и вариабельных областей легких цепей эмбрионального типа из иммунного репертуара человека.

Кроме того, считают, что генные последовательности эмбрионального типа, присутствующие у людей, имеют очень низкую иммуногенность, поэтому, по очевидным причинам, эти последовательности можно имитировать в рекомбинантных антителах с целью снижения риска иммуногенности.

Были предприняты разные подходы для оценки спариваний генов вариабельных областей тяжелых и легких цепей эмбрионального типа, преобладающих в иммунном репертуаре человека. См. de Wildt et at., Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire, J Mol Biol. 22;285(3):895-901 (January 1999), который включен посредством ссылки во всей своей полноте. Wildt с соавт.брал образцы крови от людей-доноров, сортировал IgG+B-клетки, которые претерпевали соматическую гипермутацию, амплифицировал кДНК с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция), секвенировал каждую кДНК и выравнивал каждую последовательность с известными человеческими генами вариабельных доменов эмбрионального типа. Wildt с соавт.наблюдал, что только несколько генов эмбрионального типа доминировали в иммунном репертуаре и что обычно экспрессирующиеся сегменты генов тяжелых и

легких цепей часто спариваются.

Также были предприняты попытки поддержания спариваний вариабельных доменов тяжелых и легких цепей индивидуальных В-клеток. Например, были описаны библиотеки "когнатных пар" вариабельных доменов. См. Meijer et al., Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing, J Mol Biol., 358(3):764-72 (May 5 2006); и WO 2005042774. Библиотеки согласно методам, описанным в Meijer et al., были созданы из индивидуальных В-клеток иммунизированного хозяина. Как правило, В-клетки сортируют с помощью FACS (клеточный сортер с возбуждением флуоресценции) таким образом, чтобы отобрать $CDSS^{4'}$ В-клетки, которые представляют собой соматически гипермутировавшие клетки, амплифицируют их кДНК с помощью ПЦР и продукты генов антител встраивают в Fab-векторы для селекции. Такие библиотеки когнатных пар также включают ограничения. Например, хозяева, обеспечивающие В-клетки, обычно иммунизированы, и сортированные популяции В-клеток были гипермутированными, поэтому полученные библиотеки ориентированы на конкретный иммуноген.

Кроме того, были предприняты попытки применения основных вариабельных областей тяжелых цепей или вариабельных областей легких цепей для создания библиотеки. Например, в Shi et al., "De Novo Selection of High-Affinity Antibodies from Synthetic Fab Libraries Displayed on Phage as pIX Fusion Proteins; J Mol Biol., 397(2):385-96 (26 марта 2010 г.) (который не считается предшествующим уровнем техники в отношении настоящего изобретения) и в соответствующей патентной завке WO 2009085462; и WO 2006014498, белковые последовательности вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи эмбрионального типа были включены в библиотеки на основании частоты использования в иммунном репертуаре человека.

Были также предприняты дополнительные попытки, с помощью которых включали специфическую пару эмбрионального типа в библиотеку. Например, в WO 1999020749 описана библиотека, в которой ее члены содержат тяжелые цепи, имеющие каноническую структуру гипервариабельной петли, кодируемой человеческим генным сегментом DP-47 тяжелой цепи эмбрионального типа (IGHV3-23), и/или каркасные участки, кодируемые геном эмбрионального типа, и/или легкие цепи, имеющие каноническую структуру гипервариабельной петли, кодируемые человеческим генным сегментом 02/012 легкой цепи эмбрионального типа (IGKV1-39/1D-39), и/или каркасные участки, кодируемые геном эмбрионального типа.

С использованием дополнительных подходов были созданы библиотеки непосредственно или происходящие из В-клеток. Например, Glanville et al., Precise Determination of the Diversity of a Combinatorial Antibody Library Gives Insight into the Human Immunoglobulin Repertoire, Proc NatI Acad Sci 1;106(48):20216-21 (December 2009) (который не считается предшествующим уровнем техники в отношении настоящего изобретения), в котором описана библиотека антител, построенных на разнообразии 654 человеческих донорских репертуаров иммуноглобулинов М (IgM). В частности, кДНК V-генов тяжелых и легких цепей от 654 человек-доноров раздельно амплифицировали с помощью ПЦР (выделяя пару вариабельных областей тяжелых и легких цепей) и домены тяжелых и легких цепей затем подвергали случайной реассоциации. В WO 2003052416 описано выделение В-клеток из хозяина, демонстрирующего выраженный ответ на интересующий патоген, возникающий либо в результате инфекции микроорганизмом, либо в результате лечения вакциной. В WO 2003052416, кДНК, кодирующую CDR3-участок вариабельных областей, секвенировали и конструировали фрагменты антитела, содержащие доминантные CDR3. В WO 2009100896 описано выделение В-клеток из

иммунизированного хозяина, где кДНК, кодирующие вариабельные области тяжелых и легких цепей, секвенировали и определяли относительное количество неспаренных последовательностей вариабельных областей тяжелых и вариабельных областей легких цепей. В WO 2009100896 (который не считается предшествующим уровнем техники в отношении настоящего изобретения), синтезировали библиотеки, содержащие случайно рекомбинирующие вариабельные тяжелые и вариабельные легкие цепи, где антитела были специфичны к одному иммуногену. Их краткое описание и дополнительные подходы можно найти в Fun et al., Synthetic antibodies as therapeutics, Expert Opin Biol Ther., 7(1):73-87 (January 2007).

Следовательно, существует потребность в коллекции антител или их фрагментов, которые включают пары генов вариабельных областей тяжелых цепей и вариабельных областей легких цепей эмбрионального типа, экспрессирующиеся в иммунном репертуаре человека, которые имеют подходящие биофизические свойства, приводящие к созданию легко разрабатываемых антител, которые безопасны и эффективны при применении у пациентов. Настоящее изобретение удовлетворяет этим и другим потребностям.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложено полезное решение проблемы эффективной идентификации антител против любой мишени, которые могут разрабатываться, являются безопасными и эффективными при применении у пациентов.

В наиболее общем смысле авторы изобретения начали с идеи, что библиотека антител, которая имитирует человеческую иммунную систему в основных путях, может быть наиболее предпочтительной. С одной стороны, авторы изобретения решили имитировать человеческую иммунную систему путем включения оптимальных генных последовательностей эмбрионального типа из иммунного репертуара человека в антитела. По существу, в некоторых воплощениях антитела библиотеки содержат участки, например каркасные участки, которые являются эмбриональными по последовательности. Использование последовательностей эмбрионального типа должно резко уменьшить риск иммуногенности рекомбинантных антител для терапевтического применения у пациентов.

Кроме того, авторы изобретения исходили из гипотезы, что пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующие в большом количестве в иммунном репертуаре человека, по-видимому, имеют предпочтительные биофизические свойства, которые приведут к более эффективной клинической разработке и увеличению безопасности и эффективности полученных антител при применении у пациентов. В качестве основы, каждая В-клетка кодирует одно антитело, и каждое антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Каждую вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела можно выравнивать с последовательностями эмбрионального типа для того, чтобы определить происхождение антитела, означающее, какой ген эмбрионального типа кодирует вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Поэтому для каждого антитела вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержит пару эмбрионального типа, например, VH3-23, спаренную с VK1-5.

Для того чтобы подтвердить гипотезу, что основные пары генов эмбрионального типа, по-видимому, имеют предпочтительные биофизические свойства, первая стадия заключалась в идентификации пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующих в иммунном репертуаре человека. Это делали посредством тщательного поиска в общедоступной

литературе и анализа В-клеток от человека-хозяина. На следующей стадии первоначальные данные объединяли, анализировали и пары вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи эмбрионального типа, присутствующие в иммунном репертуаре человека, ранжировали по их распространенности. Из этих данных ясно, что определенные пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи присутствовали чаще, чем другие в иммунном репертуаре человека.

Кроме того, авторы изобретения считают, что определенные пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи могут по-разному экспрессироваться в "наивных" В-клетках ("необученных" антигеном, от англ. antigen inexperienced) по сравнению с "обученными" антигеном (antigen experienced) В-клетками, поэтому полученные данные анализировали на основании развития или дифференцировки выбранных В-клеток. Из этого анализа ясно, что определенные пары генов эмбрионального типа по-разному экспрессируются в популяциях "наивных" В-клеток по сравнению с популяциями "обученных" антигеном В-клеток.

На следующей стадии следовало определить, какие пары белков эмбрионального типа необходимо протестировать, поскольку существует примерно 2500 пар в иммунном репертуаре человека. Один из способов состоял в том, чтобы протестировать пары белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые чаще всего встречаются в иммунном репертуаре человека, например, см. Таблицу 18. Можно, например, выбрать верхние четыре сотни пар для тестирования или выбрать пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, экспрессирующиеся выше определенной пороговой концентрации. Такой подход обычно требует синтеза и тестирования большого числа последовательностей пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи; поэтому такой подход может быть не очень эффективным.

В качестве альтернативного подхода авторы изобретения выбрали субпоппуляцию пар вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи эмбрионального типа, которые являются репрезентативными, точно воспроизводит или охватывает большую часть преимущественно экспрессирующихся пар из иммунного репертуара человека. Этот подход основан, частично, на наблюдении, что небольшое число генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепей является доминантным в иммунном репертуаре человека. Этот феномен описан в Wildt et al. at 895-896. Wildt с соавт.также утверждает, что обычно экспрессирующиеся генные сегменты тяжелых и легких цепей часто спариваются, и наблюдал, что половина выбранных спариваний соответствовала лишь пяти парам эмбрионального типа. Поэтому небольшое число преимущественно экспрессирующихся генов эмбрионального типа тяжелых и легких цепей (неспаренных) можно комбинировать с образованием группы пар, которые являются типичными для иммунного репертуара человека.

Этот подход осуществляли следующим образом. Собранные данные и дополнительные данные (идентифицирующие только экспрессию VH или VL, не связанных пар) анализировали для определения экспрессии генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи в иммунном репертуаре человека. На следующей стадии преимущественно экспрессирующиеся белковые последовательности

эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи (не пары) оценивали для определения их биофизических свойств, имеющих отношение к разработке. Оценивали белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи in silica в отношении следующих свойств: (1) длина CDR, (2) изоэлектрическая точка (pl) (предпочтительная изоэлектрическая точка составляет 8 или выше, которая должна обеспечивать стабильность в нейтральном буфере препарата), (3) посттрансляционные модификации (PTM) (конкретно, N-связанные сайты гликозилирования (N×S или N×T) или химические модификации, такие как отщепление Asp (часто в DP), (4) Asp изомеризация (DD, DG), (5) дезамидирование (NS, NG), которое встречается in vivo (в сыворотке) или при хранении в буфере препарата и приводит к потере антительного связывания), (6) присутствие метионинов в CDR (могут окисляться при воздействии растворителя), (7) присутствие неспаренных цистеинов (будут образовывать дисульфидные связи с другими неспаренными цистеинами, что приводит таким образом к сшиванию белков и/или более низким уровням экспрессии), (8) отклонения от эмбрионального типа, (9) присутствие возможных Т-клеточных эпитопов и (10) теоретическая склонность к агрегации.

На следующей стадии пары эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи, имеющие предпочтительные биофизические характеристики, комбинировали с образованием пар вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи. Эта субпопуляция пар, которая представляет, точно воспроизводит или охватывает большую часть преимущественно экспрессирующихся пар иммунного репертуара человека, как показано в Таблице 23. Это делали путем синтеза генов эмбрионального типа вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, комбинирования их в пары, экспрессирования пар в виде белка и тестирования каждого для идентификации их биофизических свойств. Тестировали следующие свойства: (1) относительный уровень экспонирования на фаге в Fab-формате, (2) относительный уровень экспрессии в Fab-формате, например, в E.coli; (3) термостабильность в Fab-формате; (4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате; (5) относительный уровень экспрессии в IgG-формате; (6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате.

После того как пары белков эмбрионального типа, имеющие предпочтительные биофизические свойства, были идентифицированы, конструировали коллекции для включения этих пар. Аспект настоящего изобретения относится к коллекции антител или функциональных фрагментов, содержащих пары генов эмбрионального типа вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, имеющие подходящие свойства, которые увеличивают способность к разработке, но исключающих пары генов эмбрионального типа вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, не имеющие таких свойств, даже если они преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. Таким путем конструировали коллекцию с целью исключения комбинаций или пар вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, которые встречаются в природе (из 2500 пар) и которые не имеют подходящих функциональных свойств. Например, VH4-34 часто встречается в иммунном репертуаре человека, как показано в Таблице 20, но также известно, что антитела, происходящие из этого гена тяжелой цепи эмбрионального типа, являются цитотоксичными для В-клеток, поэтому антитела, происходящие из этого гена, можно исключить из конструирования библиотеки. См. Bhat et al., Rapid

cytotoxicity of human B lymphocytes induced by VH4-34 (VH4.21) gene-encoded monoclonal antibodies, Clin Exp Immunol., 105(1); 183-90 (July 1996).

В некоторых воплощениях коллекции по настоящему изобретению включают антитела, содержащие большое число функционально ппредпочтительных комбинаций или пар вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, так что антитела из данных коллекций являются совершенно разными, образуя таким образом коллекцию, которую можно использовать для идентификации антител против любой терапевтической мишени.

Такие коллекции преодолевают многие проблемы из предшествующего уровня техники. Например, когнатная библиотека, происходящая из В-клеток, не соответствует этой концепции, так как спаривания класса VH и VL, присутствующие в такой библиотеке, идентичны спариваниям классов, присутствующих в образце В-клеток. Если взять достаточно большой образец В-клеток, то в нем будет присутствовать каждая из комбинаций спариваний класса приблизительно 50 VH и 50 VL (2500). Всестороннее тестирование пар VH и VL в настоящем описании показало, что многие пары генов VH и VL эмбрионального типа лишены свойств, которые позволяют их разработку в клинике. Поэтому такие когнатные библиотеки содержат много пар VH и VL, которые, по-видимому, не могут разрабатываться. Поэтому желательно создавать библиотеки с большим разнообразием, содержащие только пары класса VH и VL, имеющие подходящие функциональные свойства, но с подходом когнатной библиотеки это невозможно.

Кроме того, в некоторых воплощениях пары генов эмбрионального типа, содержащиеся в коллекции, основаны на образцах "наивных" или "необученных" антигеном В-клеток, поэтому представленные пары генов эмбрионального типа не ориентированы на конкретный иммуноген, и коллекции могут быть лучше при скрининге против любого иммуногена.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг.1 показаны результаты ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ) экспрессии анти-Fd после периплазматической экстракции антитела с тяжелой цепью VH3-23 (верхняя панель) и тяжелой цепью VH1-69 (нижняя панель), где каждое антитело несет одну из трех модифицированных сигнальных последовательностей phoA, содержащих С-концевые сайты рестрикции Aflll (VLS), Nhel (VLA) и Avrll (VLG), по сравнению с сигнальной последовательностью дикого типа (TKA). В группе VH3-23 все модифицированные сигнальные последовательности phoA поддерживали уровни экспрессии в диапазоне дикого типа (TKA).

На Фиг.2 показаны результаты ИФА экспрессии анти-Fd после периплазматической экстракции антитела с легкой цепью VK1-39 (левая верхняя панель), с легкой цепью VK3-11 (правая верхняя панель), с легкой цепью VL1-40 (левая нижняя панель) и с легкой цепью VL3-1 (правая нижняя панель), где каждое антитело несет одну из трех модифицированных сигнальных последовательностей ompA, содержащих С-концевые сайты рестрикции Ndel (AYG), Ndel (AYA) и BsiWI (TYA), по сравнению с сигнальной последовательностью дикого типа (AQA). Модифицированные сигнальные последовательности ompA, содержащие С-концевые сайты рестрикции, и сигнальную последовательность дикого типа тестировали с использованием Vκ и Vλ Fab-фрагментов. Сигнальная последовательность, включающая Ndel (AYA), демонстрировала постоянно такую же или даже более высокую экспрессию, чем дикий тип (AQA).

На Фиг.3 показаны сайты рестрикции, выбранные для включения в С-конец сигнальных последовательностей phoA и ompA E.coli, как подробно описано в Примерах 1-1.3, и включены сигнальные последовательности вокруг CDR3 и их соответствующие

ориентации. На этой Фигуре, при изображении сигнальных последовательностей E.coli, также представлены С-концевые сайты рестрикции, выбранные для включения в лидерные последовательности человеческой тяжелой цепи и каппа-цепи, для применения в экспрессии IgG, как подробно описано в Примере 1.5.

На Фиг.4-9 показаны пары генов VH/VL эмбрионального типа В-клеток, выделенные и описанные в Tsuiji M. et al. (2006).

На Фиг.10-12 показаны пары генов VH/VL эмбрионального типа В-клеток, выделенные и описанные в Tiller T. et al. (2007).

На Фиг.13-17 показаны пары генов VH/VL эмбрионального типа В-клеток, выделенные и описанные в Mietzner B. et al. (2008).

На Фиг.18-20 показаны пары генов VH/VL эмбрионального типа В-клеток, выделенные и описанные в Wardemann H. et al. (2003).

На Фиг.21-23 показаны пары генов VH/VL эмбрионального типа В-клеток, выделенные и описанные в Yurasov S. et al. (2005).

На Фиг.24-26 показаны пары генов VH/VL эмбрионального типа В-клеток, выделенные и описанные в Yurasov S. et al. (2006).

На Фиг.27 показана ПЦР-стратегия, используемая для амплификации кДНК одиночных отсортированных зрелых "наивных" (mn, от англ. mature naive) В-клеток и антитело-секретирующих клеток (asc), выделенных от человека-хозяина, как подробно описано в Примере 2.2.

На Фиг.28-36 показаны пары VH/VL из В-клеток, выделенных из человеческого образца, как подробно описано в Примере 2.2.

На Фиг.37 показаны 20 генов VH эмбрионального типа, выбранных для синтеза, комбинирования и функциональной характеристики, как подробно описано в Примерах 4-4.1. На Фиг.также показаны результаты in silico анализа каждого гена эмбрионального типа, где pl представляет изоэлектрическую точку, PTMs представляют посттрансляционные модификации в участках, определяющих комплементарность, как описано в данной заявке, N×S/T представляют М-связанные сайты гликозилирования, и Met в CDR представляют метионины.

На Фиг.38 показаны 8 генов Vλ и 12 генов Vk эмбрионального типа, выбранные для синтеза, комбинирования и функциональной характеристики, как подробно описано в Примерах 4-4.1. На Фиг.также показаны результаты in silico анализа каждого гена эмбрионального типа, где pl представляет изоэлектрическую точку, PTMs представляют посттрансляционные модификации в участках, определяющих комплементарность, как описано в данной заявке, N×S/T представляют М-связанные сайты гликозилирования, и Met в CDR представляют метионины.

На Фиг.39 показаны пары VH/Vк из объединенных данных из Примеров 2.1, показанных на Фиг.4-26, и Примера 2.2, показанного на Фиг.28-36. Числовые данные представляют количество каждой пары генов VH/Vк эмбрионального типа из индивидуальной В-клетки, идентифицированной в объединенных данных. На оси Y показаны гены VH эмбрионального типа, располагающиеся сверху (VH3-23) вниз (VH3-20) по частоте экспрессии в объединенных данных. На оси X показаны гены Vк эмбрионального типа, располагающиеся слева (IGKV3-20) направо (IGKV1D-17) по частоте экспрессии в объединенных данных. Число 1358 представляет собой число проанализированных В-клеток.

На Фиг.40 показаны пары VH/Vλ из объединенных данных из Примеров 2.1, показанных на Фиг.4-26, и Примера 2.2, показанного на Фиг.28-36. Числовые данные представляют число каждой пары генов VH/Vλ эмбрионального типа из индивидуальной

В-клетки, идентифицированной в объединенных данных. На оси Y показаны гены VH эмбрионального типа, располагающиеся сверху (VH3-23) вниз (VH3-20) по частоте экспрессии в объединенных данных. На оси X показаны гены Vλ эмбрионального типа, располагающиеся слева (IGLV2-14) направо (IGLV4-60) по частоте экспрессии в объединенных данных. Число 779 представляет собой число проанализированных В-клеток.

На Фиг.41 показаны пары VH/Vκ из объединенных данных из Примеров 2.1 показанных на Фиг.4-26, и Примера 2.2, показанного на Фиг.28-36, но включающих только популяции "необученных" антигеном В-клеток из незрелых В-клеток, новые эмигрирующие В-клетки и зрелые "наивные" В-клетки с целью идентификации пар VH/Vκ, выраженных в иммунном репертуаре интактного (naive) человека. Числовые данные представляет число каждой пары генов VH/VL эмбрионального типа из индивидуальной В-клетки, идентифицированной в объединенных данных. На оси Y показаны гены VH эмбрионального типа, располагающиеся сверху (VH3-23) вниз (VH3-20) по частоте экспрессии в объединенных данных. На оси X показаны гены Vκ эмбрионального типа, располагающиеся слева (IGKV3-20) направо (IGKV1D-17) по частоте экспрессии в объединенных данных. Число 888 представляет собой число проанализированных В-клеток.

На Фиг.42 показаны пары VH/Vλ из объединенных данных из Примеров 2.1, показанных на Фиг.4-26, и Примера 2.2, показанного на Фиг.28-36, но включающих только популяции "необученных" антигеном В-клеток из незрелых В-клеток, новые эмигрирующие В-клетки и зрелые "наивные" В-клетки с целью идентификации пар VH/Vλ, выраженных в иммунном репертуаре интактного человека. Числовые данные представляет число каждой пары генов VH/Vλ эмбрионального типа из индивидуальной В-клетки, идентифицированной в объединенных данных. На оси Y показаны гены VH эмбрионального типа, располагающиеся сверху (VH3-23) вниз (VH3-20) по частоте экспрессии в объединенных данных. На оси X показаны гены Vλ эмбрионального типа, располагающиеся слева (IGLV2-14) направо (IGLV4-60) по частоте экспрессии в объединенных данных. Число 457 представляет собой число проанализированных В-клеток.

На Фиг.43 показаны пары VH/Vκ из объединенных данных из Примеров 2.1, показанных на Фиг.4-26, и Примера 2.2, показанного на Фиг.28-36, но включающих только популяции "обученных" антигеном В-клеток из IgG антитело-секретирующих клеток, и IgM и IgG В-клетки памяти. Числовые данные представляет число каждой пары генов VH/Vκ эмбрионального типа из индивидуальной В-клетки, идентифицированной в объединенных данных. На оси Y показаны гены VH эмбрионального типа, располагающиеся сверху (VH3-23) вниз (VH3-20) по частоте экспрессии в объединенных данных. На оси X показаны гены Vκ эмбрионального типа, располагающиеся слева (IGKV3-20) направо (IGKV1D-17) по частоте экспрессии в объединенных данных. Число 470 представляет собой число проанализированных В-клеток.

На Фиг.44 показаны пары VH/Vλ из объединенных данных из Примеров 2.1, показанных на Фиг.4-26, и Примера 2.2, показанного на Фиг.28-36, но включающих только популяции "обученных" антигеном В-клеток из IgG антитело-секретирующих клеток, и IgM и IgG В-клетки памяти. Числовые данные представляет число каждой пары генов VH/Vλ эмбрионального типа из индивидуальной В-клетки, идентифицированной в объединенных данных. На оси показаны Y гены VH эмбрионального типа, располагающиеся сверху (VH3-23) вниз (VH3-20) по частоте

экспрессии в объединенных данных. На оси X показаны гены Vλ эмбрионального типа, располагающиеся слева (IGLV2-14) направо (IGLV4-60) по частоте экспрессии в объединенных данных. Число 322 представляет собой число проанализированных B-клеток.

На Фиг.45A-C показаны аминокислотные последовательности, кодируемые генами VH эмбрионального типа, как описано в Tomlinson et al., (1992), "The Repertoire of Human Germline Vh Sequences Reveals about Fifty Groups of Vh Segments with Different Hypervariable Loop" J. Mol. Biol. 227, 776-798; Matsuda et al. (1998), "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus" J Exp Med 188(11):2151 -62; и LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes." Exp Clin Immunogenet. 18(2): 100-16.

На Фиг.46A-C показаны аминокислотные последовательности, кодируемые генами Vκ эмбрионального типа, как описано в Schable and Zachau (1993), "The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus", Biol. Chem Hoppe Seyler. 374(11); 1001-22; Brensing-Kuppers et al. (1997), "The human immunoglobulin kappa locus on yeast artificial chromosomes (YACs)" Gene. 191 (2): 173-81; Kawasaki et al. (2001), "Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vkappa genes" Eur J Immunol 31 (4): 1017-28; и Lefranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes" Exp Clin Immunogenet, 18, 161-174.

На Фиг.47A-B показаны аминокислотные последовательности, кодируемые генами Vλ эмбрионального типа, как описано у Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research 7(3):250-61; Frippiat et al., (1995) "Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2" Hum. Mol. Genet., 4, 983-991; и LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. Exp Clin lmmunogenet.;18:242-254.

На Фиг.48 показан трицистронный фаговый дисплейный вектор pJPd1.

На Фиг.49 показан экспрессирующий вектор pJPx1 Fab.

На Фиг.50 показан экспрессирующий вектор pMx11 (pMORPHXH) Fab.

На Фиг.51 показан дисплейный вектор pMORPHSO Fab.

На Фиг.52 показан экспрессирующий вектор pJP_hJgG1f для вариабельной области тяжелой цепи IgG.

На Фиг.53 показан экспрессирующий вектор pJP_h_lg_kappa для вариабельной области к-легкой цепи IgG.

На Фиг.54 показан экспрессирующий вектор pJP_h_lg_lambda2 для вариабельной области λ-легкой цепи IgG.

На Фиг.55 показаны относительные уровни экспонирования Fab для 400 протестированных пар генов VH/VL эмбрионального типа. Более высокие значения указывают на более высокие уровни экспонирования.

На Фиг.56 показаны относительные уровни экспрессии Fab для 400 протестированных пар генов VH/VL эмбрионального типа. Более высокие значения указывают на более высокие уровни экспрессии Fab.

На Фиг.57 показаны данные по термостабильности для 400 протестированных пар генов VH/VL эмбрионального типа в Fab-формате. Числа 60 и 70 указывают на пары VH/VL, которые стабильны в течение 45 мин при 60 или 70°C в тестируемой системе. Число 4 указывает на термонестабильные пары, и bg указывает на низкие уровни экспрессии.

На Фиг.58 показаны данные по стабильности в сыворотке крупного рогатого скота для 400 протестированных пар генов VH/VL эмбрионального типа в Fab-формате. S

означает стабильные, и U - нестабильные в тестируемых условиях.

На Фиг.59 показаны данные по стабильности в мышиной сыворотке для 400 протестированных пар генов VH/VL эмбрионального типа в Fab-формате. S означает стабильные, и U - нестабильные в тестируемых условиях.

На Фиг.60 показаны относительные уровни экспрессии IgG для 400 протестированных пар генов VH/VL эмбрионального типа. Более высокие значения указывают на более высокие уровни экспрессии IgG1.

На Фиг.61 показаны данные по стабильности в сыворотке для 400 протестированных пар генов VH/VL эмбрионального типа в IgG-формате. S означает стабильные, и U - нестабильные в тестируемых условиях.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Для того чтобы облегчить понимание изобретения, предложены следующие определения и иллюстрации.

Основные термины

Термины "примерно" или "приблизительно" в контексте числовых значений и диапазонов относятся к значениям или диапазонам, которые приблизительно равны или близки к таким представленным значениям или диапазонам, что изобретение может осуществляться как и предполагается, таким как имеющие желательное значение или процент гомологии последовательности, как очевидно специалисту из идей, содержащихся в данной заявке. Это является следствием, по меньшей мере частично, варьирующих культуральных условий и вариабельности биологических систем. Таким образом, эти термины охватывают значения за пределами значений, полученных из систематической погрешности. Эти термины выражают ясно то, что подразумевается. Как правило, "примерно" охватывает ±10% представленного значения. Поэтому термин "примерно" можно использовать для описания диапазона.

Все диапазоны, представленные в данной заявке в кратком изложении сущности и описании изобретения, включают все числа или значения около них или между числами диапазона. Все диапазоны по изобретению точно определяют и представляют все целые числа, десятичные числа и дробные величины в данном диапазоне.

Термин "субъект" включает человека и животных, не являющихся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, коровы, цыплята, земноводные и пресмыкающиеся. За исключением указанных случаев, термины "пациент" или "субъект" используют в данной заявке взаимозаменяемо.

Термин "лечение" включает введение композиций или антител для предупреждения или замедления появления симптомов, осложнений или биохимических признаков заболевания, смягчения симптомов или прекращения или ингибирования дальнейшего развития заболевания, состояния или расстройства. Поэтому лечение охватывает, но не ограничивается этим, "излечение". Лечение может быть профилактическим (для предупреждения или замедления начала заболевания или для предупреждения или замедления проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтической супрессией или смягчением симптомов после проявления заболевания.

"База данных или читаемый носитель", как использовано в данной заявке, относится к любому формату для хранения данных о последовательностях и, таким образом, к любой коллекции информации, такой как файл базы данных, поисковая таблица, сводная таблица Excel или тому подобное. В некоторых воплощениях базу данных хранят в

электронной форме, такой как машиночитаемое запоминающее устройство. Оно включает носители информации, такие как сервер, клиент, жесткий диск, CD, DVD, персональное информационное устройство, такое как Palm Pilot, ленточный носитель, zip диск, встроенный в компьютер ROM (постоянное запоминающее устройство) или Интернет или всемирная паутина. Другие средства для хранения файлов, доступные для компьютера, очевидны специалисту в данной области техники.

"In silico" относится к манипуляциям, анализу и конструкциям, выполняемым на компьютере, но которые могут быть выполнены на бумаге или в уме.

Антитела и их свойства

Используемый в данной заявке термин "антитело" включает целые антитела. Антитело может быть поликлональным, аффинноочищенным поликлональным, моноклональным, полностью человеческим, антителом мыши или грызуна, химерным, верблюжьим или гуманизированным антителом. Антитело может относиться к любому классу антител, такому как IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA (включая человеческие подклассы 1дА1 и lgA2), IgD, IgE, IgG или IgM. Встречающееся в природе "антитело" представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями.

Используемый в данной заявке термин "его функциональный фрагмент" включает любой антиген-связывающий фрагмент, такой как Fab, F(ab')2, Fab', Fv, scFv, одиночные цепи, которые включают Fc-участок, нанотела и другие антителоподобные структуры, имеющие остовы, отличные от каркасных участков вариабельных областей. Термин "его функциональный фрагмент" включает, но не ограничивается этим, любой функциональный участок антитела, где функция включает связывание иммуногена или эффекторную функцию.

Используемый в данной заявке термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в антигенных сайтах. В пределах каждого антигенного сайта вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует посредством нековалентных сил с антигеном в многочисленных сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность. Используемый в данной заявке термин "высокая аффинность" для антитела или его функционального фрагмента, такого как IgG антитело, относится к антителу, имеющему KD 10^{-8} M или меньше, 10^{-9} M или меньше, или 10^{-10} M или меньше, или 10^{-11} M или меньше для целевого антигена. Однако связывание с "высокой аффинностью" может варьировать для других изотипов антител. Например, связывание с "высокой аффинностью" для IgM изотипа относится к антителу, имеющему KD 10^{-7} M или меньше, или 10^{-8} M или меньше.

Используемый в данной заявке термин "Кассоц." или "Ка" предназначен для обозначения скорости ассоциации конкретного антитело-антигенного взаимодействия, где термин "Кдис." или "Kd", используемый в данной заявке, относится к скорости диссоциации конкретного антитело-антигенного взаимодействия. Термин "KD", используемый в данной заявке, предназначен для обозначения константы диссоциации, которая получена из отношения Kd к Ка (т.е. Kd/Ka) и выражается в виде молярной концентрации (M). Значения KD для антител можно определить с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Способ определения KD антитела осуществляют с использованием поверхностного плазменного резонанса или с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Термины "кросс-блок", "кросс-блокированные" и "кросс-блокирование", используемые в данной заявке взаимозаменяемо, означают способность антитела или

другого связывающего агента препятствовать связыванию других антител или связывающих агентов с той же мишенью в стандартном анализе конкурентного связывания. Способность или степень, с которой антитело или другой связывающий агент могут препятствовать связыванию другого антитела или связывающей молекулы с той же мишенью, и поэтому можно ли указанный кросс-блок согласно изобретению определить с использованием стандартных анализов конкурентного связывания. Один подходящий анализ включает применение технологии Biacore (например, с использованием прибора BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Швеция)), при котором можно измерять степень взаимодействий с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса. В другом анализе для измерения кросс-блокирования используют подход на основе ИФА.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядные характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не с последними, не происходит в присутствии денатурирующих растворителей.

Термин "химерное антитело" представляет собой молекулу антитела, в которой константная область или ее часть изменена, замещена или заменена таким образом, чтобы антиген-связывающий сайт (вариабельная область) был связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функцией и/или видом.

Термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM, IgE, IgG такому как IgG1 или IgG4), который обеспечивается генами константной области тяжелой цепи. Изотип также включает модифицированные версии одного из этих классов, где были сделаны модификации для изменения Fc-функции, например, для увеличения или уменьшения эффекторных функций или связывания с Fc-рецепторами.

Термин "эмбриональный тип" означает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитела или их функциональные фрагменты, которые передаются от родителей потомству.

Термин "белковая последовательность эмбрионального типа" означает:

а) аминокислотную последовательность вариабельной области антитела или его функционального фрагмента, кодируемую геном эмбрионального типа, б) аминокислотную последовательность, кодируемую модифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область антитела или его функционального фрагмента, имеющего такую же аминокислотную последовательность вариабельной области антитела или его функционального фрагмента, кодируемого геном эмбрионального типа, где последовательность нуклеиновой кислоты модифицирована, например, посредством оптимизации кодонов, добавления желательных сайтов рестрикции, оптимизированного GC-содержания, удаления нежелательных сайтов сплайсинга или удаления мотивов нестабильности мРНК, или в) аминокислотную последовательность, кодируемую геном эмбрионального типа, но с точечными мутациями в аминокислотной последовательности, такими как удаление нежелательного цистеина или введение желательных сайтов рестрикции, например BbsI, или которые являются результатом ошибок синтеза, амплификации или клонирования.

Термин "генная последовательность эмбрионального типа" означает: а) последовательность нуклеиновой кислоты гена эмбрионального типа, кодирующую

вариабельную область антитела или его функциональный фрагмент, или б) модифицированную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область антитела или его функционального фрагмента, имеющего такую же аминокислотную последовательность, как вариабельная область антитела, кодируемого геном эмбрионального типа, где последовательность нуклеиновой кислоты модифицирована, например, посредством оптимизации кодонов, добавления желательных сайтов рестрикции, оптимизированного GC-содержания, удаления нежелательных сайтов сплайсинга или удаления мотивов нестабильности мРНК.

Термин "пара(ы) генов эмбрионального типа" означает пару последовательностей нуклеиновых кислот и их соответствующий ген эмбрионального типа, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела или его функционального фрагмента. Например, пара генов эмбрионального типа может представлять собой VH3-23/VK1-5, где антитело, кодируемое VH3-23/VK1-5, содержит вариабельную область тяжелой цепи или ее часть, кодируемую геном VH3-23 эмбрионального типа, и вариабельную область легкой цепи или ее часть, кодируемую геном Vк1-5 эмбрионального типа.

Термин "пара белков эмбрионального типа" означает антитело или его функциональный фрагмент, где вариабельная область тяжелой цепи или ее часть и вариабельная область легкой цепи или ее часть а) кодируются специфическим геном эмбрионального типа или б) кодируются модифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область антитела или его функционального фрагмента, имеющего такую же аминокислотную последовательность, как вариабельная область антитела, кодируемого специфическим геном эмбрионального типа, где последовательность нуклеиновой кислоты модифицирована, например, посредством оптимизации кодонов, добавления желательных сайтов рестрикции, оптимизированного GC-содержания, удаления нежелательных сайтов сплайсинга или удаления мотивов нестабильности мРНК, или в) каждая содержит аминокислотную последовательность, кодируемую геном эмбрионального типа, но с точечными мутациями в аминокислотной последовательности, например, с целью удаления нежелательного цистеина или введения желательных сайтов рестрикции, например BbsI, или которые являются результатом ошибок в синтезе, амплификации или клонировании. Например, пара белков эмбрионального типа может представлять собой антитело или функциональный фрагмент, кодируемый VH3-23/VK1-5, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи или ее часть, кодируемую геном эмбрионального типа VH3-23, и вариабельную область легкой цепи или ее часть, кодируемую геном эмбрионального типа Vid-5. "Пара белков эмбрионального типа" включает конструкции, полученные в Примере 5, которые содержат:

а) для VH: лидерную последовательность (модифицированную phoA, включающую RE сайт NheI, как показано на Фиг.3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 эмбрионального типа (включающие RE сайт BssHII, как показано на Фиг.3); CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) антитела 4D5, как использовано в Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; и JH4 FR4 (включающий RE сайт XhoI/SalI как показано на Фиг.3);

б) для Vк: лидерную последовательность (ompA, включающую RE сайт NdeI, как показано на Фиг.3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 эмбрионального типа (включающие RE сайт BbsI, как показано на Фиг.3), каппа-подобный CDR-L3 (QQHYTTPPT) согласно Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; и Jk1 FR4 (включающий RE сайт KpnI, как показано на Фиг.3); и

в) для Vλ: лидерную последовательность (ompA, включающую RE сайт NdeI, как

показано на Фиг.3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 эмбрионального типа (включающие RE сайт Bbsl, как показано на Фиг.3), лямбда-подобный CDR-L3 (QSYDSSLSGV5) согласно Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; и JI2/3 FR4 (включающий RE сайт Kpnl, как показано на Фиг.3).

Каждую из этих конструкций синтезировали, экспрессировали и тестировали в виде Fab и IgG, как описано в Примерах 6 и 7, в отношении следующих функциональных свойств: а) относительный уровень экспонирования после получения фагов и фаговый ИФА в Fab-формате; б) относительные уровни экспрессии Fab после продукции Fab в E.coli, лизиса клеток E.coli и ИФА-детекции продуцируемого Fab; в) термостабильность Fab после продукции Fab в E.coli, лизиса клеток E.coli и ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации при повышенных температурах; г) стабильность Fab из лизатов E.coli в сыворотке крупного рогатого скота/мышей посредством ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей; д) относительные уровни экспрессии человеческого IgG1 после продукции IgG1 в клетках млекопитающих и ИФА-детекции секретируемого IgG1 из супернатантов клеточных культур; и е) стабильность человеческого IgG1 в сыворотке крупного рогатого скота, как определено посредством ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей.

Термин "по существу белковая последовательность эмбрионального типа" означает аминокислотную последовательность, кодируемую геном эмбрионального типа, но с точечными мутациями в аминокислотной последовательности, например, с целью удаления нежелательного цистеина или введения желательных сайтов рестрикции, например Bbsl, или которые являются результатом ошибок синтеза, амплификации или клонирования.

"Гены эмбрионального типа" представляют собой нуклеиновые кислоты генов эмбрионального типа, кодирующих антитела или их функциональные фрагменты, раскрытые в следующих публикациях, для VH: Tomlinson et al., (1992), "The Repertoire of Human Germline Vh Sequences Reveals about Fifty Groups of Vh Segments with Different Hypervariable Loop" J. Mol. Biol. 227, 776-798; Matsuda et al. (1998), "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus" J Exp Med 188(11): 2151-62; и LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes". Exp Clin Immunogenet. 18(2): 100-16; для Vλ: Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research 7(3):250-61; Frippiat et al., (1995) "Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2" Hum. Mol. Genet, 4, 983-991; и LeFranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. Exp Clin Immunogenet.; 18:242-254; и для Vκ: Schable and Zachau (1993), "The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus", Biol. Chem Hoppe Seyler. 374(11): 1001-22; Brensing-KQppers et al. (1997), "The human immunoglobulin kappa locus on yeast artificial chromosomes (YACs)" Gene. 191 (2): 173-81; Kawasaki et ai. (2001), "Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vkappa genes" Eur J Immunol 31 (4):1017-28; и Lefranc MP (2001) "Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes" Exp Clin Immunogenet., 18, 161-174, которые все включены в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

Последовательности JH4 для вариабельной области тяжелой цепи, Jκ1 для вариабельной области к-легкой цепи и JA2/3 для вариабельных областей Л-легкой цепи описаны в следующих публикациях: Scaviner et al., (1999), "Protein displays of the human

immunoglobulin heavy, kappa and lambda variable and joining regions" Exp Clin Immunogenet. 1б(4):234-40; для JH: Ravetch et al., (1981), "Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes". Cell 27 (3 pt 2): 583-91; для JK: Hieter et al. (1982), "Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes". J Biol Chem 257(3):1516-22; для JL: Kawasaki et al., (1997) "One-Megabase Sequence Analysis of the Human immunoglobulin lambda Gene Locus" Genome Research 7(3):250-61, которые все включены в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Последовательность JH4 представляет собой (YFDYWGQGTLVTVSS); последовательность Jк1 представляет собой (WTFGQGTKVEIK); и последовательность JA2/3 представляет собой (WFGGGTKLTVL).

Термин "позиционно-зависимая частота использования аминокислот" относится к вероятности наличия конкретной аминокислотной последовательности в данном положении в полипептиде. В настоящем изобретении позиционно-зависимая частота использования аминокислот определяли для перестроенных аминокислотных последовательностей, классифицированных с помощью индивидуального гена эмбрионального типа. Это обеспечивает индивидуальную, точную конструкцию CDR в контексте его природного эмбрионального типа.

Термин "вариабельный домен/область (VH или VL)" означает область иммуноглобулина, которая содержит один или более доменов Ig, по существу кодируемых любой из нуклеиновых кислот VL (включающих Vk и Vλ), VH, JL (включающих Jк и JA) и JH, которые составляют генетические локусы легкой цепи (включающие к и А) и тяжелой цепи иммуноглобулина, соответственно. Вариабельная область (VL и VH) легкой или тяжелой цепи состоит из "каркасного" или "FR" участка с рассеянными тремя гипервариабельными участками, называемыми "участками, определяющими комплементарность" или "CDRs". Протяженность каркасного участка и CDRs были точно определены (см. Kabat, 1991, J. Immunol., 147, 915-920.; Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. B/o/. 196: 901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883; AI-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273: 927-948). Каркасные участки антитела, т.е. комбинированные каркасные участки, составляющие легкие и тяжелые цепи, служат для позиционирования и выравнивания CDRs, которые в первую очередь ответственны за связывание с антигеном.

Термин "каркасный участок" означает вариабельный домен антитела, как определено Kabat с соавт.(1991), в виде части вариабельного домена, которая служит каркасом для антиген-связывающих петель этого вариабельного домена. Примеры каркасных участков включают FR1, FR2, FR3 и FR4 либо вариабельной области тяжелой, либо вариабельной области легкой цепи.

Термин "участок, определяющий комплементарность" или "CDR" означает антигенсвязывающие петли антитела, как описано Kabat с соавт.(1991). Каждый из двух вариабельных доменов Fv-фрагмента антитела содержит три CDRs. Участки, определяющие комплементарность, включают CDR1, CDR2 и CDR3 либо вариабельной области тяжелой, либо вариабельной области легкой цепи.

"Предпочтительная пара класса VH и VL" означает такие пары класса VH и VL, которые являются предпочтительными в иммунном репертуаре, например, в иммунном репертуаре человека, согласно пороговой совокупности критериев. Например, пары VH-VL, которые часто встречаются, или имеют предпочтительные биофизические свойства, такие как низкая иммуногенность; стабильность; легко экспонируются и/или экспрессируются, или пары VH-VL, которые появляются в концентрации по меньшей мере 0,05% в образце из примерно 2500 В-клеток человека. Пары класса VH и VL,

предпочтительные в иммунном репертуаре человека, могут иметь предпочтительные характеристики по сравнению с другими парами класса VH и VL.

Термин "наивный" означает "необученный" антигеном.

Термин "наивная В-клетка" означает В-клетку, в которой нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их функциональные фрагменты, не подвергались соматической гипермутации, поэтому считаются содержащими нуклеиновые кислоты генов эмбрионального типа, с наличием перестройки генных сегментов V(D)J. Популяции В-клеток, считающихся "наивными", представляют собой незрелые В-клетки, новые эмигрирующие В-клетки и зрелые "наивные" В-клетки.

Термин "иммунный репертуар интактного человека" означает репертуар нуклеиновых кислот, выделенных из "необученных" антигеном В-клеток из иммунной системы человека, где нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их функциональные фрагменты, не подвергались соматической гипермутации, поэтому рассматриваются как содержащие нуклеиновые кислоты генов эмбрионального типа, с наличием перегруппировки генных сегментов V(D)J. Репертуар может представлять собой репертуар индивидуума или популяции. Настоящее изобретение подходит для определения иммунного репертуара отдельного индивидуума при условии получения достаточного количества В-клеток. Предпочтительно, иммунный репертуар получают от множества индивидуумов во избежание деформации выборки.

Термин "иммунный репертуар человека" означает репертуар нуклеиновых кислот, выделенных из В-клеток иммунной системы человека. Репертуар может представлять собой репертуар индивидуума или популяции и может состоять из "наивных" В-клеток и/или "необученных" антигеном В-клеток. Настоящее изобретение подходит для определения иммунного репертуара отдельного индивидуума при условии получения достаточного количества В-клеток. Предпочтительно, иммунный репертуар получают от множества индивидуумов во избежание деформации выборки.

"Антиген" и "иммуноген" определяют как любую молекулу, которая специфически связывается антителом.

Термин "специфический в отношении иммуногена" означает специфическую ассоциацию между антителом и соответствующей молекулой.

"Диверсификация CDR" или "диверсифицированные CDR", как использовано в данной заявке, представляют собой модификацию аминокислотных последовательностей с CDRs любым подходящим способом. CDRs представляют собой, как известно, иммуногенсвязывающие участки, поэтому имеющие коллекции, содержащие члены, представляющие большое разнообразие в пределах CDRs, которое увеличивает вероятность того, что коллекция будет содержать антитела или его фрагменты, имеющие специфичность и оптимальные свойства в отношении любого иммуногена. Разнообразие получают путем варьирования аминокислотного состава одного или более CDRs. Этого можно достичь любыми способами, известными специалисту в данной области, включая способы, описанные в данной заявке.

"Коллекция синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты", означает, что все нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитело или его фрагмент, являются синтетическими, но не относятся к другим нуклеиновым кислотам, таким как векторы, которые могут быть функциональным образом связаны с такими синтетическими нуклеиновыми кислотами.

Термины, используемые в контексте молекулярной биологии

Термин "синтез" или "синтезировали" означает синтез гена, где последовательности нуклеиновых кислот синтезируют в физическую ДНК, содержащую полинуклеотиды.

Стандартный синтез ДНК включает однонуклеотидный синтез, где получают одноцепочечные олигонуклеотиды и затем перекрывающиеся олигонуклеотиды лигируют с использованием ПЦР-подобной сборки. Компании, такие как Sloning (Puchheim, Германия), Geneart (Regensburg, Германия), DNA2.0 (Menio Park, CA, США) и Genscript (Piscataway, NJ, США) предоставляют технологию синтеза генов. Sloning, например, использует набор заранее подготовленных двухцепочечных триплетных нуклеотидов, которые отжигают и последовательно лигируют.

Термин "синтетический" описывает молекулу, которую получают посредством синтеза или синтезируют.

Термин "коллекция" или "библиотека" означает по меньшей мере два члена. Термин "член" включает, но не ограничивается этим, нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их фрагменты, или сами антитела или их фрагменты.

Термин "хозяин" относится к любому хозяину, включающему млекопитающее, такое как человек, мышь или грызун, мыши, крысы, белки, бурундуки, суслики, дикообразы, бобры, хомяки, песчанки, морские свинки, кролики, собаки, кошки, коровы или лошади.

Термин "нуклеиновая кислота" используют в данной заявке взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам, как в одно-, так и в двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные скелетные остатки или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые имеют сходные связывающие свойства с исходной нуклеиновой кислотой. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-0-метилрибонуклеотиды и пептид-нуклеиновые кислоты (PNAs).

Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно охватывает их консервативно модифицированные варианты (например, замены на основе вырожденности кодонов) и комплементарные последовательности, а также косвенно указанную последовательность. В частности, как указано ниже, замены на основе вырожденности кодонов могут достигаться путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено остатком со смешанным основанием (mixed-base) и/или дезоксиинозиновым остатком (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka e/ al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

Термин "функциональным образом связанный" относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Как правило, это относится к функциональной взаимосвязи транскрипционной регуляторной последовательности с транскрипционной последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функциональным образом связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой эспрессирующей системе. Как правило, промоторные транскрипционные регуляторные последовательности, которые функциональным образом связаны с транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к транскрибируемой последовательности, т.е. они являются цис-действующими. Однако некоторые транскрипционные регуляторные последовательности, такие как энхансеры, не обязательно должны быть физически смежными или расположенными в непосредственной близости к кодирующим последовательностям, транскрипцию

которых они усиливают.

Используемый в данной заявке термин "кодон-оптимизированный" или "оптимизация кодонов" означает, что нуклеотидная последовательность была изменена с целью кодирования аминокислотной последовательности с использованием кодонов, которые являются предпочтительными в продуцирующей клетке или организме. Оптимизированную нуклеотидную последовательность конструируют для сохранения аминокислотной последовательности, первоначально кодируемой исходной нуклеотидной последовательностью. Кроме того, можно сконструировать нуклеотидную последовательность, полностью или насколько возможно лишенных ингибиторных мотивов, сайтов сплайсинга, мотивов нестабильности мРНК и нежелательных сайтов рестрикции. Она также может быть оптимизирована в отношении GC-содержания, желательных сайтов рестрикции и других параметров. Последовательности можно оптимизировать в отношении экспрессии в разных хозяевах, включая бактериальные или эукариотические клетки. Аминокислотные последовательности, кодируемые оптимизированными нуклеотидными последовательностями, также называются оптимизированными.

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют способом, аналогичным природным аминокислотам. К природным аминокислотам относятся аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые впоследствии модифицируются, например, гидроксипролин, у-карбоксиглутамат и 0-фосфосерин. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, как и природная аминокислота, т.е. альфа-углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные скелеты, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как и природная аминокислота. Аминокислотные миметики относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют таким же образом, как природные аминокислоты.

Термины "полипептид" и "белок", используемые взаимозаменяемо в данной заявке, относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Данные термины используются для аминокислотных полимеров, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также природных аминокислотных полимеров и неприродных аминокислотных полимеров. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также косвенно охватывает ее консервативно модифицированные варианты.

Термин "консервативно модифицированный вариант" относится как к аминокислотной, так и к нуклеиновокислотной последовательности. В отношении конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, консервативно модифицированные варианты относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, то по существу к идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода большое число функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой данный белок. Например, все кодоны GCA, GCC,

GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в любом положении, где аланин уточняется кодоном, этот кодон можно заменить на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновых кислот представляют собой "молчащие варианты", которые представляют собой один вид консервативно модифицированных вариантов. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в данной заявке, которая кодирует полипептид, также описывает любой возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалист поймет, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана), который можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

Для полипептидных последовательностей, "консервативно модифицированные варианты" включают индивидуальные замены, делеции или добавления к полипептидной последовательности, которые приводят к замене аминокислоты на химически подобную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, представляющие функционально подобные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнительными и не исключают полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей по изобретению. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) Аланин (A), Глицин (G); 2) Аспарагиновая кислота(O), Глутаминовая кислота (E); 3) Аспарагин (N), Глутамин (Q); 4) Аргинин (R), Лизин (K); 5) Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M), Валин (V); 6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y), Триптофан (W); 7) Серин (S), Треонин (T); и 8) Цистеин (C), Метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)). В некоторых воплощениях термин "консервативные модификации последовательности" используют для обозначения модификаций аминокислот, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют связывающие характеристики антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Термины "идентичный" или "процент идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. 60% идентичности, возможно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности в определенной области, или, когда не определено, во всей последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в пределах окна сравнения или предполагаемой области, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или выравнивания вручную и визуальной оценки. В некоторых случаях идентичность находится в пределах области, которая имеет длину по меньшей мере примерно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно в пределах области, которая имеет длину от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот). Для сравнения последовательностей, обычно одна последовательность действует в качестве ссылочной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемую и ссылочную последовательности вводят в компьютер, задают координаты подпоследовательности, если необходимо, и задают

параметры программы алгоритма последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или устанавливать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно последовательности сравнения на основании параметров программы.

"Окно сравнения", используемое в данной заявке, включает ссылку на сегмент из любого количества смежных положений, выбранных из группы, состоящей из количества от 20 до 600, обычно от примерно 50 до примерно 200, чаще всего от примерно 100 до примерно 150, в котором последовательность можно сравнивать с последовательностью из того же количества смежных положений после оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Методы выравнивания последовательностей для их сравнения хорошо известны в области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для их сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии (Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c), с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии (Needleman and Wunsch, J. Mol. B/o/. 48:443, 1970), с помощью метода поиска сходства (Pearson and Lipman, Proc. Nat'1. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988), с помощью компьютерных реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wl), или с помощью выравнивания вручную и визуального оценки (см., например, Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (2003)).

Два примера алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представляют собой алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul etal., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., J. Mol. B/o/. 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для выполнения BLAST анализов общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information). Этот алгоритм включает, в первую очередь, идентификацию пар последовательностей с высоким сходством (HSPs, от англ. high scoring sequence pairs) путем идентификации коротких слов длиной W в последовательности запроса (query), которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому значению T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T называют пороговым счетом соседства слова (neighborhood word score threshold) (Altschul et al., supra). Эти удачные попытки с исходным словом соседства действуют как семена для инициации поисков содержащих его более длинных HSPs. Удачные попытки со словом распространяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока общий счет выравнивания может увеличиваться. Общий счет вычисляют, используя для нуклеотидных последовательностей параметры M ("награда" для пары за совпадение остатков; всегда>0) и N ("штраф" за несовпадение остатков; всегда<0). Для аминокислотных последовательностей, для вычисления общего счета используют матрицу замен. Расширение попадания слов в каждом направлении прекращается, когда: суммарный счет выравнивания снижается на величину X от его максимально достигнутого значения; суммарный счет достигает нуля или ниже из-за накопления одного или более выравниваний негативно-оцененных остатков; или при достижении конца любой последовательности. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) или 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных

последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину слова 3 и ожидание (E) 10 и матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoffand Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787, 1993). Одним из показателей сходства, обеспечиваемого алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая позволяет судить о вероятности совпадения между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, которое происходит случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с ссылочной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с ссылочной нуклеиновой кислотой составляет менее чем примерно 0,2, более предпочтительно менее чем примерно 0,01, и наиболее предпочтительно менее чем примерно 0.001.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно также определить с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу PAM 120 весов остатков, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступна на сайте afwww.qca.com). используя либо матрицу Blossom 62, либо матрицу PAM250 и вес за пробел 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и вес за длину 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Помимо процента идентичности последовательностей, указанного выше, другим признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептиды по существу идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестие реагирует с антителами, полученными против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно по существу идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы или их комплементы гибридизуются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже. Еще одним признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что одинаковые праймеры можно использовать для амплификации последовательности.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, в которую встроен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки-субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях в результате либо мутации, либо влияния окружающей среды, такое потомство фактически не может быть идентично родительской клетке, но все еще включено в объем термина "клетка-хозяин", используемого в данной заявке. Типичными клетками-хозяевами являются прокариотические клетки (такие как бактериальные, включая, но не ограничиваясь этим, E.coli) или эукариотические (которые включают клетки дрожжей, млекопитающих и более).

Термин "вектор" предназначен для обозначения полинуклеотидной молекулы,

способной переносить другой полинуклеотид, с которым он связан. Предпочтительными векторами являются векторы, способные к автономной репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны. Векторы, способные направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функциональным образом связаны, называются в данной заявке "экспрессирующими векторами". Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК петле, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликация и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функциональным образом связаны. Такие векторы называются в данной заявке "рекомбинантными экспрессирующими векторами" (или просто "экспрессирующими векторами"). В общем, экспрессирующие векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазмида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако предполагается, что изобретение включает и другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Векторы, как правило, включают прокариотический репликон, который может включать прокариотический промотор, способный направлять экспрессию (транскрипцию и трансляцию) VH- и/или VL-кодирующих гомологов в бактериальной клетке-хозяине, такой как Eschehchia co//, трансформированной им. Промотор представляет собой элемент, контролирующий экспрессию, образованный ДНК последовательностью, которая обеспечивает связывание РНК-полимеразы и осуществление транскрипции. Промоторные последовательности, совместимые с бактериальными хозяевами, как правило, представлены в плазмидных векторах, содержащих подходящие сайты рестрикции для вставки ДНК-сегмента. Примеры таких плазмидных векторов включают коммерчески доступные pUC8, pUC9, pBR322 и pBR329, pPL и pKK223.

"Дисплейный вектор" включает последовательность ДНК, обладающую способностью к прямой репликации и поддержанию рекомбинантной молекулы ДНК вне хромосомы в клетке-хозяине, такой как бактериальная клетка-хозяин, трансформированная им. Такие последовательности ДНК хорошо известны в данной области. Дисплейные векторы могут представлять собой, например, фаговые векторы или фагмидные векторы, происходящие из нитевидного бактериофага класса fd, M13 или fl. Такие векторы способны облегчать экспонирование включенного белка, например связывающего белка или его фрагмента, на поверхности нитевидного бактериофага. Дисплейные векторы, подходящие для экспонирования на фаге, рибосомах, ДНК, бактериальных клетках или эукариотических клетках, например клетках дрожжей или млекопитающих, также хорошо известны в данной области, например, как вирусные векторы или векторы, кодирующие химерные белки.

Сайты рестрикции, которые являются "уникальными", представляют собой сайты

рестрикции, которые существуют или появляются только один раз на данной молекуле нуклеиновой кислоты.

Коллекции и способы их получения и применения

В настоящем описании представлены коллекции антител или их функциональных фрагментов, которые могут быть использованы в идентификации терапевтического антитела против любой мишени, где антитела могут клинически разрабатываться, являются безопасными и эффективными у пациентов. В качестве предпосылки, авторы изобретения предположили, что пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, распространенные в иммунном репертуаре человека, по-видимому, имеют предпочтительные биофизические свойства, которые будут приводить к более эффективной разработке и увеличению безопасности и эффективности полученных антител у пациентов. Каждая В-клетка кодирует одно антитело, и каждое антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Каждую вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела можно выравнивать с генной последовательностью эмбрионального типа с целью определения происхождения антитела, содержания, из которого был образован ген эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи. Поэтому для каждого антитела можно сказать, что вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержат пару генов эмбрионального типа, например VH3-23, спаренный с VK1-5. Такие предпочтительные биофизические свойства могут включать: а) высокий относительный уровень экспонирования в Fab-формате; б) высокие относительные уровни экспрессии Fab; в) термостабильность Fab; г) стабильность Fab в сыворотке крупного рогатого скота/мышей; д) высокие относительные уровни экспрессии человеческого IgG1; и е) стабильность человеческого IgG1 в сыворотке крупного рогатого скота.

Для того чтобы доказать гипотезу, что пары генов эмбрионального типа, по-видимому, имеют предпочтительные биофизические свойства, первая стадия заключалась в идентификации пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, экспрессирующихся в иммунном репертуаре человека. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ получения коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, включающий стадию получения данных о парах генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующих в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях данные получены из общедоступной литературы, в которой предложены пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи. Как правило, в соответствующей общедоступной литературе представлены следующие способы: В-клетки выделяли из людей-доноров, В-клетки сортировали с целью определения стадии их развития или дифференцировки, получали и амплифицировали кДНК, представляющую ДНК, кодирующую антитело из каждой В-клетки, кДНК секвенировали, кДНК, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, выравнивали с известными генными последовательностями эмбрионального типа и определяли пары генов эмбрионального типа из каждой В-клетки. В некоторых воплощениях данные получали в результате отбора образцов и выделения человеческих В-клеток, которые включали способ, аналогичный способу, используемому в литературе. В этих аспектах способ получения коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов включает стадию получения данных о

парах генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующих в иммунном репертуаре человека; где стадия получения дополнительно включает стадии: аа) выделение человеческих В-клеток из образца; аб) получение кДНК из В-клеток; ав) ПЦР-амплификация кДНК из В-клеток; аг) секвенирование ПЦР-продуктов; и ад) идентификация генов эмбрионального типа ПЦР-продуктов. Оба набора данных представляли пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые присутствуют в иммунном репертуаре человека.

На следующей стадии первоначальные данные собирали, анализировали и пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующие в иммунном репертуаре человека, располагали в соответствии с уровнем экспрессии. В этих аспектах настоящее изобретение включает способ получения коллекции антител или их функциональных фрагментов, включающий идентификацию пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека.

Пары генов эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующиеся в иммунном репертуаре человека

Исходя из этих данных, стало ясно, что в иммунном репертуаре человека некоторые пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи присутствуют чаще, чем другие. Поскольку эти главные пары, как ожидается, имеют лучшие биофизические свойства, то аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, происходящих из пар генов эмбрионального типа, которые выделяются в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов происходят из пар генов эмбрионального типа, которые выделяются в иммунном репертуаре человека. В других аспектах настоящее изобретение включает коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие по существу белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат по существу белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В других аспектах настоящее изобретение включает коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, где указанные гены эмбрионального типа преимущественно

экспрессируются в иммунном репертуаре человека.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят по существу из пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более CDRs состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят из пар белков эмбрионального типа, которые кодируются парами генами эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующимися в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более CDRs состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях большая часть или по существу все антитела или их функциональные фрагменты из данных коллекций содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека.

В некоторых воплощениях пары генов эмбрионального типа, которые часто встречаются или преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, экспрессируются в концентрации по меньшей мере 0,05% в иммунном репертуаре человека, по меньшей мере 0,09% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,14% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,19% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,23% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,28% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,33% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,37% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,42% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,47% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,51% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,56% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,61% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,66% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,70% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,84% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,89% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,94% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,03% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,12% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,17% в иммунном репертуаре человека; или по меньшей мере 1,26% в иммунном репертуаре человека.

Дополнительный аспект настоящего изобретения состоит в возможности использовать коллекцию в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Предположили, что создание коллекций по меньшей мере

с двумя парами белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, могло бы обеспечить разнообразие в пределах коллекции, особенно в пределах определяющих комплементарность областей антител из коллекции, в отношении длины CDR и разнообразия конформаций или канонических структур. Это позволяет использовать коллекции по настоящему изобретению в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Поэтому некоторые аспекты изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере три различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере четыре различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере пять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере шесть различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере семь различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере восемь различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере девять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере десять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере одиннадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере двенадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере тринадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере четырнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере пятнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере шестнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере семнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере восемнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере девятнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере двадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 21 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 22 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 23 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 24 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 25 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 26 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 27 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 28 различных белков эмбрионального типа вариабельных областей тяжелых цепей; по меньшей мере 29 различных последовательностей пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 30 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 31 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 32 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 33 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 34 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 35 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 36 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 37 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 38 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 39 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 40 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 41 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 42 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 43 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 44 различных белков эмбрионального типа вариабельных областей тяжелых цепей; по меньшей мере 45 различных последовательностей пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 46 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 47 различных пар белков эмбрионального

типа; по меньшей мере 48 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 49 различных пар белков эмбрионального типа; или по меньшей мере 50 различных пар белков эмбрионального типа, выбранных из преимущественно экспрессирующихся пар белков эмбрионального типа иммунного репертуара человека.

В некоторых воплощениях коллекции содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи, содержащие одну или более пар белков эмбрионального типа, выбранных из пар генов эмбрионального типа, показанных в Таблице 18.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает выделенное антитело или его функциональный фрагмент, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, содержащий FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пары генов эмбрионального типа, где пара генов эмбрионального типа выбрана из пар генов эмбрионального типа из Таблицы 18.

Пары генов эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующиеся в иммунном репертуаре интактного человека

Также предполагают, что некоторые пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи могут по-разному экспрессироваться в "наивных" В-клетках ("необученных" антигеном) по сравнению с "обученными" антигеном В-клетками, поэтому данные анализировали на основании развития или дифференцировки выбранных В-клеток. Коллекции, содержащие пары белков эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, по-разному экспрессирующиеся в "наивных" В-клетках, могут быть выгодными для выбора антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Поэтому аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, происходящие из пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов происходят из пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируется в иммунном репертуаре интактного человека. В других аспектах настоящее изобретение включает коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие по существу белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат по существу белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека. В других аспектах настоящее изобретение включает коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает

коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа и где указанные белковые последовательности эмбрионального типа содержат пары белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные пары белков эмбрионального типа кодируются парами генов эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующимися в иммунном репертуаре интактного человека.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят по существу из пар белков эмбрионального типа, кодируемых парами генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят из пар белков эмбрионального типа, которые кодируются парами генов эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующимися в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях большинство или по существу все антитела или их функциональные фрагменты из коллекций содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека.

В некоторых воплощениях пары генов эмбрионального типа, которые часто встречаются или преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека, экспрессируются в концентрации по меньшей мере 0,07% в иммунном репертуаре интактного человека, по меньшей мере 0,15% в иммунном репертуаре интактного человека; по меньшей мере 0,22% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,30% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,37% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,45% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,52% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,59% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,67% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,74% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,82% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,89% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 0,97% в иммунном репертуаре интактного человека по меньшей мере 1,19% в иммунном репертуаре интактного человека; или по меньшей мере 1,56% в иммунном репертуаре интактного человека.

Дополнительный аспект настоящего изобретения состоит в возможности использовать коллекции в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Предположили, что создание коллекций по меньшей мере

с двумя парами белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые кодируются парами генов эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующимися в иммунном репертуаре интактного человека, могло бы обеспечить разнообразие в пределах коллекции, особенно в пределах определяющих комплементарность областей антител из коллекции, в отношении длины CDR и разнообразия конформаций или канонических структур. Это позволяет использовать коллекции по настоящему изобретению в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Поэтому некоторые аспекты изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере три различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере четыре различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере пять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере шесть различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере семь различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере восемь различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере девять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере десять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере одиннадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере двенадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере тринадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере четырнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере пятнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере шестнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере семнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере восемнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере девятнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере двадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 21 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 22 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 23 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 24 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 25 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 26 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 27 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 28 различных белков эмбрионального типа вариабельных областей тяжелых цепей; по меньшей мере 29 различных последовательностей пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 30 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 31 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 32 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 33 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 34 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 35 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 36 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 37 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 38 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 39 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 40 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 41 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 42 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 43 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 44 различных белков эмбрионального типа вариабельных областей тяжелых цепей; по меньшей мере 45 различных последовательностей пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 46 различных пар белков

эмбрионального типа; по меньшей мере 47 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 48 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 49 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 49 различных пар белков эмбрионального типа; или по меньшей мере 50 различных пар белков эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях коллекции содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи, содержащие одну или более пар белков эмбрионального типа, выбранных из пар генов эмбрионального типа из Таблицы 19.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает выделенное антитело или его функциональный фрагмент, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, содержащие FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа, содержащие пару белков эмбрионального типа, где указанная пара белков эмбрионального типа выбрана из пар генов эмбрионального типа из Таблицы 19.

Гены эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи, преимущественно экспрессирующиеся в иммунном репертуаре человека

На следующей стадии объединенные данные и дополнительные данные анализировали для определения экспрессии генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи в иммунном репертуаре человека. Поэтому дополнительные аспекты настоящего изобретения включают способы получения коллекции антител или их функциональных фрагментов, включающие стадию идентификации генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. Один способ сделать это заключается в ранжировании генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи на основании уровня их экспрессии.

Антитела, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, кодируемые генами эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующимися в иммунном репертуаре человека, по-видимому, имеют предпочтительные биофизические свойства, которые улучшают разработку, безопастность и эффективность у пациентов. Поэтому аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, происходящие из генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов происходят из генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В других аспектах настоящее изобретение включает коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие по существу белковые последовательности эмбрионального типа генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих

комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат по существу белковые последовательности эмбрионального типа генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека. В других аспектах настоящее изобретение включает коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа, где указанные белковые последовательности эмбрионального типа кодируются генами эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, кодируемых генами эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, кодируемых генами эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях большинство или по существу все антитела или их функциональные фрагменты из коллекций содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые генами эмбрионального типа, которые преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре интактного человека.

В некоторых воплощениях гены вариабельной области тяжелой цепи эмбрионального типа, которые часто встречаются или преимущественно экспрессируются в иммунном

репертуаре человека, экспрессируются в концентрации по меньшей мере 0,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,2% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,3% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,4% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,0% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 2,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 2,2% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 2,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 2,7% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 3,0% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 3,2% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 3,3% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 4,0% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 4,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 4,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 4,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 5,3% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 5,8% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 6,8% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 7,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 8,0% в иммунном репертуаре человека или по меньшей мере 10,6% в иммунном репертуаре человека.

В некоторых воплощениях гены вариабельной области к-легкой цепи эмбрионального типа, которые часто встречаются или преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, экспрессируются в концентрации по меньшей мере 0,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,2% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,3% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,4% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,7% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,0% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,3% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере1.9% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 2,2% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 2,4% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 2,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 4,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 6,0% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 7,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 8,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 11,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 11,2% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 14,2% в иммунном репертуаре человека; или по меньшей мере 16,2% в иммунном репертуаре человека

В некоторых воплощениях гены эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи, которые часто встречаются или преимущественно экспрессируются в иммунном репертуаре человека, экспрессируюся в концентрации по меньшей мере 0,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,3% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 0,6% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,0% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,2% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 1,7% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 4,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 5,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 5,3% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 6,5% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 8,1% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 10,0% в иммунном репертуаре человека; по меньшей мере 11,3% в иммунном репертуаре человека; или по меньшей

мере 18,1% в иммунном репертуаре человека

Дополнительный аспект настоящего изобретения состоит в возможности использовать коллекции в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Предположили, что создание коллекций с одним или более генами вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепью эмбрионального типа, преимущественно экспрессирующимися в иммунном репертуаре человека, могло бы обеспечить разнообразие в пределах коллекции, особенно в длине CDR и конформациях или канонических структурах, которые позволяют использовать данные коллекции в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Воплощения настоящего изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере три различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере четыре различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере пять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере шесть различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере семь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере восемь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере девять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере десять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере одиннадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере двенадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере тринадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере четырнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере пятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере шестнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере семнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере восемнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере девятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере двадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 21 различную белковую последовательность эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 22 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 23 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 24 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 25 различных белковых последовательностей эмбрионального типа

вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 26 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 27 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 28 различных вариабельных областей тяжелой цепи белка эмбрионального типа; по меньшей мере 29 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 30 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 31 различную белковую последовательность эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 32 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 33 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 34 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 35 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 36 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелей цепи; по меньшей мере 37 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 38 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 39 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 40 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 41 различную белковую последовательность эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 42 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 43 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 44 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 45 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 46 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 47 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 48 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 49 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи.

Воплощения настоящего изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере три различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере четыре различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере пять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере шесть различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере семь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере восемь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по

меньшей мере девять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере десять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере одиннадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере двенадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере тринадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере четырнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере пятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере шестнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере семнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере восемнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере девятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере двадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 21 различную белковую последовательность эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 22 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 23 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 24 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 25 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 26 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 27 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 28 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 29 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 30 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 31 различную белковую последовательность вариабельной области к-легкой цепи эмбрионального типа; по меньшей мере 32 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 33 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 34 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере 35 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи.

Воплощения настоящего изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере три различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере четыре различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по

меньшей мере пять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере шесть различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере семь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере восемь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере девять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере десять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере одиннадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере двенадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере тринадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере четырнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере пятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере шестнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере семнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере восемнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере девятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере двадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 21 различную белковую последовательность эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 22 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 23 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 24 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 25 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 26 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 27 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 28 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 29 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 30 различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 31 различную белковую последовательность эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 32 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере 33 различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи.

В некоторых воплощениях коллекции содержат антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат одну

или более белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из: IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV4-39; IGHV4-34; IGHV4-59; IGHV1-69; IGHV5-51; IGHV3-7; IGHV1-18; IGHV3-48; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV1-2; IGHV3-33; IGHV4-31; IGHV3-53; IGHV3-11; IGHV3-9; IGHV4-4; IGHV1-46; IGHV3-74; IGHV1-24; IGHV4-61; IGHV1-8; IGHV1-3; IGHV3-49; IGHV3-43; IGHV4-28; IGHV3-64 и IGHV7-81.

В некоторых воплощениях коллекции содержат антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат одну или более белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из: IGKV3-20; IGKV1-39/1D-39; IGKV1-5; IGKV3-15; IGKV4-1; IGKV3-11; IGKV2-28/2D-28; IGKV1-33/1D-33; IGKV2-30; IGKV1-9; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-8; IGKV1-16; IGKV1-6; IGKV1-12; IGKV2D-29; IGKV1-13; IGKV1D-8HlGKV2-24.

В некоторых воплощениях коллекции содержат антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат одну или более белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из: IGLV2-14; IGLV1-40; IGLV1-44; IGLV1-51; IGLV2-23; IGLV3-21; IGLV1-47; IGLV3-1; IGLV2-11; IGLV2-8; IGLV6-57; IGLV3-25; IGLV7-46; IGLV1-36; IGLV7-43; IGLV9-49; IGLV4-69; IGLV2-18; IGLV3-10 и IGLV3-27.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает выделенное антитело или его функциональный фрагмент, содержащие FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа, выбранные из группы, состоящей из: IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV4-39; IGHV4-34; IGHV4-59; IGHV1-69; IGHV5-51; IGHV3-7; IGHV1-18; IGHV3-48; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV1-2; IGHV3-33; IGHV4-31; IGHV3-53; IGHV3-11; IGHV3-9; IGHV4-4; IGHV1-46; IGHV3-74; IGHV1-24; IGHV4-61; IGHV1-8; IGHV1-3; IGHV3-49; IGHV3-43; IGHV4-28; IGHV3-64; IGHW-81; IGKV3-20; IGKV1-39/1D-39; IGKV1-5; IGKV3-15; IGKV4-1; IGKV3-11; IGKV2-28/2D-28; IGKV1-33/1D-33; IGKV2-30; IGKV1-9; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-8; IGKV1-16; IGKV1-6; IGKV1-12; IGKV2D-29; IGKV1-13; IGKV1D-8; IGKV2-24; IGLV2-14; IGLV1-40; IGLV1-44; IGLV1-51; IGLV2-23; IGLV3-21; IGLV1-47; IGLV3-1; IGLV2-11; IGLV2-8; IGLV6-57; IGLV3-25; IGLV7-46; IGLV1-36; IGLV7-43; IGLV9-49; IGLV4-69; IGLV2-18; IGLV3-10;и IGLV3-27.

Гены эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи, имеющие предпочтительные биофизические свойства

На следующей стадии оценивали главные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи для определения их биофизических свойств, связанных с разработкой. Белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи оценивали in silico в отношении следующих свойств: длина CDR, изоэлектрическая точка (pl), где предпочтительная изоэлектрическая точка составляет 7,5 или выше, поскольку это должно обеспечивать стабильность в стандартном буфере для приготовления препаратов с pH от 5,5 до 7, посттрансляционные модификации (PTM) в участках, определяющих комплементарность (конкретно, N-связанных сайтах гликозилирования (N×S или N×T), или химические

модификации, такие как отщепление Asp (часто в DP), Asp изомеризация (DD, DG), дезамидирование (NS, NG), которое может происходить in vivo (в сыворотке) или при хранении в буфере для приготовления препаратов и приводит к потере связывания антитела), присутствие метионинов в CDRs (могут окисляться при воздействии растворителя), присутствие неспаренных цистеинов (будут образовывать дисульфидные связи с любым другим неспаренным цистеином, приводя таким образом к сшиванию белков и/или более низким уровням экспрессии), отклонения от эмбрионального типа, присутствие потенциальных Т-клеточных эпитопов и теоретическая склонность к агрегации.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает способ получения коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, включающий стадии: а) идентификации белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, обладающих следующими свойствами: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; и 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5; и б) создания коллекции антител или их функциональных фрагментов, содержащей последовательности генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, идентифицированные в (а)

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, происходящих из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов происходят из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих такие свойства.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие по существу белковые последовательности эмбрионального типа белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат по существу белковые последовательности эмбрионального типа из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих такие свойства.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи белка эмбрионального типа, имеющего такие свойства.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, не содержащие неспаренные цистеины.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, содержащие четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; три или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; две или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; одну или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность или никаких посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, происходящих из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5; по меньшей мере 8,0; по меньшей мере 8,5; по меньшей мере 9 или по меньшей мере 9,5.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющие одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, содержащие по меньшей мере два из следующих свойств:

1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих

комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющие по меньшей мере четыре из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющие по меньшей мере четыре из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их фунциональные фрагменты содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющие по меньшей мере пять из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их фунциональные фрагменты содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющие следующие свойства: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; и 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую

склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях большинство или по существу все антитела или их функциональные фрагменты из коллекций содержат белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, имеющие одно или более из следующих свойств: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

Некоторые воплощения включают коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа, где указанные белковые последовательности эмбрионального типа имеют следующие свойства: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; и 5) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

Некоторые воплощения включают коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области

тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа, где указанные белковые последовательности эмбрионального типа имеют следующее свойство: 1) один или меньше неспаренных цистеинов.

Некоторые воплощения включают коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа, где указанные белковые последовательности эмбрионального типа имеют следующие свойства: 1) один или меньше неспаренных цистеинов; 2) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов.

Некоторые воплощения включают коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа, где указанные белковые последовательности эмбрионального типа имеют следующие свойства: 1) один или меньше неспаренных цистеинов; 2) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; и 3) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

Некоторые воплощения включают коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа, где указанные белковые последовательности эмбрионального типа имеют следующие свойства: 1) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 2) один или меньше неспаренных цистеинов; 3) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; и 4) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

Дополнительный аспект настоящего изобретения состоит в возможности использовать коллекции в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Предположили, что создание коллекций с одной или более белковыми последовательностями эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи могло бы обеспечить разнообразие в пределах коллекции, особенно в длине CDR и конформациях или канонических структурах, таким образом позволяя использовать коллекцию в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена.

Воплощения настоящего изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере три различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере четыре различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере пять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере шесть различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере семь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере восемь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере девять различных белковых последовательностей эмбрионального типа

вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере десять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере одиннадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере двенадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере тринадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере четырнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере пятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере шестнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере семнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере восемнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере девятнадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или по меньшей мере двадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, имеющие следующие свойства: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

Воплощения настоящего изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере три различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере четыре различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере пять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере шесть различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере семь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере восемь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере девять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере десять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере одиннадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи; по меньшей мере двенадцать различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи, обладающих следующими свойствами: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

Воплощения настоящего изобретения включают коллекции, содержащие антитела

или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере три различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере четыре различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере пять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере шесть различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере семь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи; по меньшей мере восемь различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи, обладающих следующими свойствами: 1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность; 2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность; 3) один или меньше неспаренных цистеинов; 4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов; 5) среднюю или низкую склонность к агрегации; или 6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5.

В некоторых воплощениях коллекции содержат антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат одну или более белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из: IGHV1-2; IGHV1-18; IGHV1-69; IGHV1-46; IGHV3-7; IGHV3-11; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV3-33; IGHV3-48; IGHV3-53; IGHV3-73; IGH3-74; IGHV4-4; IGHV4-31; IGHV4-39; IGHV 5-51 и IGHV6-1.

В некоторых воплощениях коллекции содержат антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат одну или более белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из: IGKV1-5; IGKV1-6; IGKV1-9; IGKV1-12; IGKV1-16; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-39; IGKV2-30; IGKV3-11; IGKV3-15 и IGKV3-20.

В некоторых воплощениях коллекции содержат антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат одну или более белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из: IGLV1-40; IGLV1-47; IGLV1-51; IGLV2-11; IGLV2-23; IGLV2-14; IGLV3-1 и IGLV3-21.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает выделенное антитело или его функциональный фрагмент, содержащие FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа, выбранные из группы, состоящей из: IGHV1 -2; IGHV1 -18; IGHV1 -69; IGHV1-46; IGHV3-7; IGHV3-11; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV3-33; IGHV3-48; IGHV3-53; IGHV3-73; IGH3-74; IGHV4-4; IGHV4-31; IGHV4-39; IGHV 5-51; IGHV6-1; IGKV1-5; IGKV1-6; IGKV1-9; IGKV1-12; IGKV1-16; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-39; IGKV2-30; IGKV3-11; IGKV3-15; IGKV3-20; IGLV1-40; IGLV1-47; IGLV1-51; IGLV2-11; IGLV2-23; IGLV2-14; IGLV3-1 и IGLV3-21.

Пары генов эмбрионального типа, имеющие предпочтительные биофизические

свойства

На следующей стадии нужно было определить, какие пары белков эмбрионального типа нужно было исследовать, поскольку имеется примерно 2500 пар в иммунном репертуаре человека. Один способ заключался в тестировании пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые встречаются преимущественно в иммунном репертуаре человека, например, см. Таблицу 18. Например, можно выбрать верхние четыреста пар для тестирования или выбрать пары белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, экспрессирующиеся выше определенной пороговой концентрации. Поэтому аспекты настоящего изобретения включают способы получения коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, где стадия получения дополнительно включает стадию идентификации пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, экспрессирующихся в концентрации по меньшей мере 0,05% в иммунном репертуаре человека; образования антител или их функциональных фрагментов, содержащих идентифицированные пары белков эмбрионального типа; и оценку следующих свойств указанной пары белков эмбрионального типа: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате; 2) уровень экспрессии в Fab-формате; 3) термостабильность при 60°C или больше в Fab-формате в течение по меньшей мере 45 минут; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в Fab-формате в течение более 10 суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

Этот подход требует синтеза и исследования большого числа последовательностей пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи; поэтому такой подход не может быть очень эффективным.

В качестве альтернативного подхода авторы изобретения выбрали субпопуляцию пар вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи эмбрионального типа, которая представляет, точно воспроизводит или охватывает большую часть преимущественно экспрессирующихся пар из иммунного репертуара человека. Этот подход был основан частично на наблюдении, что небольшое число генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи является доминантным в иммунном репертуаре человека. Wildt с соавт.на с.895-896 описывает это явление. Wildt с соавт.также сообщает, что обычно экспрессирующиеся генные сегменты тяжелой и легкой цепи часто спарены, и обнаружил, что половина тестируемых пар соответствует только пяти парам эмбрионального типа. Поэтому небольшое число преимущественно экспрессирующихся генов эмбрионального типа тяжелой и легкой цепи (неспаренных) можно комбинировать с получением группы пар, которая является типичной для иммунного репертуара человека.

Поэтому аспекты настоящего изобретения включают коллекции антител или их фрагментов, содержащие пары белков эмбрионального типа, которые представляют, точно воспроизводят или охватывают большую часть преимущественно экспрессирующихся пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи иммунного репертуара человека или иммунного репертуара интактного человека. Как описано ниже, подход авторов изобретения дает в результате коллекции, содержащие антитела или их фрагменты, которые могут в полной мере разрабатываться, поскольку пары белков эмбрионального

типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи сначала тестируют в отношении предпочтительных биофизических свойств и затем конструируют коллекции для включения пар белков эмбрионального типа, имеющих одно или более из этих предпочтительных биофизических свойств.

Аспекты настоящего изобретения включают способы получения коллекции антител или их функциональных фрагментов, включающие стадию идентификации пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab pMx11_FH VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способы получения коллекции антител или их функциональных фрагментов, включающие создание коллекции антител или их функциональных фрагментов, содержащей каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные один или более каркасных участков содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют одно или более из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C. В некоторых воплощениях участки FR1, FR2 и FR3 содержат белковые последовательности эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях участки FR1, FR2 и FR3 содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки CDR1 и CDR2 содержат белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки CDR1 и CDR2 содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 содержат белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участок FR4 содержит участок JH4 тяжелой цепи. В некоторых воплощениях участок FR4 содержит участок

Jk1 легкой цепи. В некоторых воплощениях участок FR4 содержит участок JA2/3 легкой цепи.

В других воплощениях настоящее изобретение включает способы получения коллекций антител или их функциональных фрагментов, включающие получение коллекции, где получение дополнительно включает стадии синтеза нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их функциональные фрагменты; клонирование нуклеиновых кислот в вектор; и экспрессирование антител или их функциональных фрагментов.

Как только преимущественно экспрессирующаяся или репрезентативная группа пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи была синтезирована и протестирована, можно было конструировать коллекции, включающие пары белков эмбрионального типа, имеющие предпочтительные биофизические свойства.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, происходящих из пар белков эмбрионального типа, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов происходят из пар белков эмбрионального типа, имеющих такие свойства.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие по существу белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат по существу белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих такие свойства.

Аспекты настоящего изобретения включают коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих одно или более из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-

формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C, где в некоторых воплощениях один или более каркасных участков и/или определяющих комплементарность областей антител или их функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих такие свойства.

В некоторых аспектах коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих одно или более следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLAVI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях каркасные участки, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, содержат участки FR1, FR2 и FR3. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки CDR1 и CDR2 содержат белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки CDR1 и CDR2 содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 содержат белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участки FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях участок FR4 содержит участок JH4 тяжелой цепи. В некоторых воплощениях участок FR4 содержит участок JK1 легкой цепи. В некоторых воплощениях участок FR4 содержит участок JA2/3 легкой цепи.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей по меньшей мере два из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате

по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей по меньшей мере три из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей по меньшей мере четыре из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей по меньшей мере пять из следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей следующие свойства: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLAVI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-

формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей одно или более следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей одно или более следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLAVI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекции синтетических антител или их функциональных фрагментов содержат каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей одно или более следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей одно или более следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLAVI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень

экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях большинство или по существу все антитела или их функциональные фрагменты из коллекций содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей одно или более следующих свойств: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых аспектах антитела или их функциональные фрагменты из коллекций содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих одно или более из следующих свойств:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей следующие свойства: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей следующие свойства: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекция синтетических антител или их функциональных фрагментов содержит каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и

вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, где указанная пара белков эмбрионального типа обладает следующими свойствами: 1) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; и 2) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекция синтетических антител или их функциональных фрагментов содержит каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, где указанная пара белков эмбрионального типа обладает следующими свойствами: 1) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 2) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 3) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекция синтетических антител или их функциональных фрагментов содержит каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, где указанная пара белков эмбрионального типа обладает следующими свойствами: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 3) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более, чем десяти суток при 37°C; и 4) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях коллекция синтетических антител или их функциональных фрагментов содержит каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, где указанная пара белков эмбрионального типа обладает следующими свойствами: 1) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 2) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 3) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 4) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR003080; и 5) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В других воплощениях коллекции по настоящему изобретению содержат коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, где указанная пара белков эмбрионального типа обладает следующими свойствами: 1) термостабильность при

60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 2) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 3) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR003080; и 4) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В других воплощениях коллекции по настоящему изобретению и/или способы получения таких коллекций включают антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей относительный уровень экспонирования в Fab-формате по меньшей мере 0,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 0,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 0,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 0,4 по сравнению с контролем;

по меньшей мере 0,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 0,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 0,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 0,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 0,9 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 1,9 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 2,9 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 3,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 4,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 4,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 4,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 4,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 4,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 4,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 5,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 5,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 5,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 5,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 5,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 5,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 5,9 по сравнению с контролем; по меньшей мере 6,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 6,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 6,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 6,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 6,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 6,9 по сравнению с контролем; по меньшей мере 7,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 7,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 7,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 7,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 7,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,4 по сравнению с контролем; по меньшей

мере 8,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 8,9 по сравнению с контролем; по меньшей мере 9,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 9,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 9,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 9,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 9,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 9,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 9,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 10,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 10,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 10,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 10,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 10,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 10,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 10,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 11,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 11,2 по сравнению с контролем; по меньшей мере 11,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 11,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 11,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 11,8 по сравнению с контролем; по меньшей мере 12,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 12,3 по сравнению с контролем; по меньшей мере 12,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 12,9 по сравнению с контролем; по меньшей мере 13,0 по сравнению с контролем; по меньшей мере 13,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 14,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 14,5 по сравнению с контролем; по меньшей мере 16,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 16,6 по сравнению с контролем; по меньшей мере 16,7 по сравнению с контролем; по меньшей мере 17,1 по сравнению с контролем; по меньшей мере 19,4 по сравнению с контролем; по меньшей мере 27,3 по сравнению с контролем; или по меньшей мере 29,0 по сравнению с контролем.

В некоторых воплощениях коллекция синтетических антител или их функциональных фрагментов содержит каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, где указанная пара белков эмбрионального типа имеет относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 10% выбранных Fabs;

значение не ниже 15% выбранных Fabs; значение не ниже 20% выбранных Fabs; значение не ниже 25% выбранных Fabs; значение не ниже 30% выбранных Fabs; значение не ниже 35% выбранных Fabs; значение не ниже 40% выбранных Fabs; значение не ниже 45% выбранных Fabs; значение не ниже 50% выбранных Fabs; значение не ниже 55% выбранных Fabs; значение не ниже 60% выбранных Fabs; значение не ниже 65% выбранных Fabs;

значение не ниже 70% выбранных Fabs; значение не ниже 75% выбранных Fabs; значение не ниже 80% выбранных Fabs; значение не ниже 85% выбранных Fabs; или значение не ниже 90% выбранных Fabs.

В других воплощениях коллекции по настоящему изобретению и/или способы получения таких коллекций включают антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей относительный уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,1 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 0,2 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 0,3 по сравнению с Fab VH1-69 VLA__VI1-40 AYA;

по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 0,5 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 0,6 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 0,7 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 0,8 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 0,9 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 1,0 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; no меньшей мере 1,1 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; по меньшей мере 1,2 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; или по меньшей мере 1,3 по сравнению с Fab VH1-69 VLA.VI1-40 AYA.

В других воплощениях коллекции по настоящему изобретению и/или способы получения таких коллекций включают антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей термостабильность при 70°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; или имеющей термостабильность при 80°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате.

В других воплощениях коллекции по настоящему изобретению и/или способы получения таких коллекций включают антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, имеющей относительный уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,1 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,2 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,3 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,5 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,6 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,7 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,8 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 0,9 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,0 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,1 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,2 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,3 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,4 по сравнению с MOR03080no меньшей мере 1,5 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,6 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,7 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,8 по сравнению с MOR03080; по меньшей мере 1,9 по сравнению с MOR03080.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает коллекции и способы получения или применения коллекций антител или их функциональных фрагментов, содержащих одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа, по существу последовательности эмбрионального типа или последовательности, происходящие из белковых последовательностей эмбрионального типа. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат CDR1 и CDR2, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат CDR1 и CDR2, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа.

В некоторых аспектах один или более каркасных участков содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа. Как в некоторых аспектах, FR4 выбрана из группы, состоящей из JH4, Jκ1 и JA2/3. Как показано на Фиг.45A-47 B, белковые последовательности эмбрионального типа содержат только FR1-FR3. Поэтому в некоторых аспектах, когда указанные каркасные

участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа, FR1, FR2 и/или FR3 содержат белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых аспектах один или более каркасных участков содержат белковые последовательности эмбрионального типа, что способствует разнообразию одной или более областей, определяющих комплементарность. В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекции и способы продуцирования и получения указанных коллекций синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащих диверсифицированный участок HCDR3. В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекции и способы получения и применения указанных коллекций синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащих диверсифицированный участок LCDR3.

Дополнительный аспект настоящего изобретения состоит в возможности использовать коллекции в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена. Предположили, что создание коллекций по меньшей мере с двумя парами белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, обладающими вышеупомянутыми функциональными свойствами, будет обеспечивать разнообразие в пределах коллекции, особенно в пределах определяющих комплементарность областей антител из коллекции, в отношении длины CDR и разнообразия конформаций или канонических структур. Это позволяет использовать коллекции по настоящему изобретению в идентификации антител или их функциональных фрагментов против любого иммуногена.

Некоторые воплощения изобретения включают коллекции, содержащие антитела или их функциональные фрагменты, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковую последовательность эмбрионального типа пары генов эмбрионального типа, имеющую следующие свойства: 1) относительный уровень экспонирования в Fab, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C, где указанная коллекция содержит антитела или их функциональные фрагменты, содержащие по меньшей мере две различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере три различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере четыре различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере пять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере шесть различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере семь различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере восемь различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере девять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере десять различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере одиннадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере двенадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере тринадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере четырнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере пятнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере шестнадцать различных пар белков

эмбрионального типа; по меньшей мере семнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере восемнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере девятнадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере двадцать различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 21 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 22 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 23 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 24 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 25 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 26 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 27 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 28 различных белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 29 различных последовательностей пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 30 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 31 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 32 различные пары белков эмбрионального типа по меньшей мере 33 различные пары белков эмбрионального типа по меньшей мере 34 различные пары белков эмбрионального типа по меньшей мере 35 различных пар белков эмбрионального типа по меньшей мере 36 различных пар белков эмбрионального типа по меньшей мере 37 различных пар белков эмбрионального типа по меньшей мере 38 различных пар белков эмбрионального типа по меньшей мере 39 различных пар белков эмбрионального типа по меньшей мере 40 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 41 различную пару белков эмбрионального типа; по меньшей мере 42 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 43 различные пары белков эмбрионального типа; по меньшей мере 44 различных белка эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере 45 различных последовательностей пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 46 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 47 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 48 различных пар белков эмбрионального типа; по меньшей мере 49 различных пар белков эмбрионального типа или по меньшей мере 50 различных пар белков эмбрионального типа.

Антитела или их функциональные фрагменты, содержащие генные последовательности эмбрионального типа

Кроме того, предположили, что использование белковых последовательностей эмбрионального типа должно снизить риск иммуногенности антител при введении пациентам. Поэтому аспекты настоящего изобретения включают коллекции и способы получения и применения указанных коллекций синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащих каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антител или их функциональных фрагментов содержат по существу последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антител или их функциональных фрагментов происходят из последовательностей эмбрионального типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участки FR1, FR2, FR3 и FR4, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа, по существу последовательности эмбрионального типа или происходят из белковых последовательностей эмбрионального

типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат FR1, FR2, FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа репрезентативной пары белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях используемая участок FR4 представляет собой JH4 для вариабельной области тяжелой цепи, Jk1 для вариабельной области к- легкой цепи и JA2/3 для вариабельной области λ-легкой цепи.

Также, поскольку использование белковых последовательностей эмбрионального типа должно снижать риск иммуногенности антител при введении пациентам, некоторые аспекты настоящего изобретения включают коллекции и способы получения или применения коллекций антител или их функциональных фрагментов, содержащих одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа, по существу последовательности эмбрионального типа или происходящие из белковых последовательностей эмбрионального типа. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат CDR1 и CDR2, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат CDR1 и CDR2, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа.

В некоторых аспектах один или более каркасных участков содержат белковые последовательности эмбрионального типа, обеспечивающие разнообразие одной или более областей, определяющих комплементарность. В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекции и способы продуцирования и получения указанных коллекций синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащих диверсифицированный участок HCDR3. В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекции и способы получения и применения указанных коллекций синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащих диверсифицированный участок LCDR3. CDRs можно конструировать с помощью методов, хорошо известных в данной области, включая описанные в Knappik et al. 2000; WO 97/08320; WO 2008053275; WO 2009036379 WO 2007056441; WO 2009114815, которые все включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Кроме того, для получения коллекций, содержащих антитела или их функциональные фрагменты, имеющие низкий риск иммуногенности, в некоторых аспектах коллекция по настоящему изобретению и способы ее получения и использования включают антитела или их функциональные фрагменты, содержащие человеческие последовательности.

В некоторых аспектах коллекция по изобретению содержит по меньшей мере 1×10^4; по меньшей мере 1×10^5; по меньшей мере 1×10^6; по меньшей мере 1×10^7; по меньшей мере 1×10^8; по меньшей мере 1×10^9; по меньшей мере 1×10^{10}; или по меньшей мере 1×10^{11} последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих антитела или их функциональные фрагменты, или антител или их функциональных фрагментов.

В некоторых аспектах антитела или их функциональные фрагменты из коллекций являются синтетическими.

В некоторых аспектах коллекции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их функциональные фрагменты.

Дополнительные воплощения настоящего изобретения

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки

вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа,

где указанная пара белков эмбрионального типа обладает следующими свойствами:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs;

2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;

3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и

6) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C;

где указанная коллекция антител или их функциональных фрагментов содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере двух различных пар белков эмбрионального типа, и

где указанная пара белков эмбрионального типа кодируется парой генов эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят по существу из белковых последовательностей эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих следующие свойства:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs;

2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;

3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и

6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи состоят из белковых последовательностей эмбрионального типа пар белков эмбрионального типа, имеющих следующие свойства:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs;

2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;

3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-

формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и

6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в иммунном репертуаре человека в концентрации по меньшей мере 0,05%. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,23% в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,51% в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,07% в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,52% в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,88% в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат человеческие последовательности. В некоторых воплощениях указанная коллекция антител или их функциональных фрагментов содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере семнадцати различных пар белков эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участки FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участок FR4, выбранный из группы, состоящей из JH4, Jк1 и JA2/3. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок HCDR3. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок LCDR3.

В некоторых воплощениях коллекция содержит 1×10^4 антител или их функциональных фрагментов. В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 60% выбранных Fabs. В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA. В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют термостабильность при 70°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате. В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с MOR03080.

В некоторых воплощениях каркасные участки вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа выбранной из группы, состоящей из: IGHV3-23/IGKV1-5; IGHV3-23/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV3-15; IGHV3-23/IGKV3-15; IGHV4-39/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-18/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV3-20; IGHV4-

39/IGKV1-5; IGHV1-69/IGKV1-39/1D-39; IGHV5-51/IGLV1-40; IGHV4-39/IGKV3-20; IGHV3-23/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-21; IGHV3-23/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-30/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-69/IGKV3-20; IGHV3-48/IGKV3-20; IGHV1-2/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV4-1; IGHV5-51/IGLV2-14; IGHV5-51/IGKV3-20; IGHV3-7/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-7/IGKV1-5; IGHV3-15/IGKV3-20; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV3-23/IGKV3-11; IGHV3-30/IGKV1-5; IGHV3-30/IGKV3-15; IGHV3-21/IGKV1-5; IGHV3-21/IGKV3-15; IGHV3-30/IGLV1-51; IGHV3-21/IGLV1-51 и IGHV1-69/IGKV3-11.

В некоторых воплощениях указанные функциональные фрагменты указанных антител выбраны из группы, состоящей из Fab, F(ab')2, Fab', Fv и scFv.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает коллекцию нуклеиновых кислот, кодирующих описанные коллекции антител. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает вектор, содержащий нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные коллекции антител. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные коллекции антител. В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин является прокариотической или эукариотической. В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку E.coli или млекопитающего.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает коллекцию синтетических антител или их функциональных фрагментов, содержащую каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи,

где указанные каркасные участки содержат белковые последовательности эмбрионального типа,

где указанные белковые последовательности эмбрионального типа имеют следующие свойства:

1) четыре или меньше посттрансляционных модификаций в участках, определяющих комплементарность;

2) два или меньше метионинов в участках, определяющих комплементарность;

3) один или меньше неспаренных цистеинов;

4) один или меньше потенциальных Т-клеточных эпитопов;

5) среднюю или низкую склонность к агрегации; и

6) изоэлектрическую точку по меньшей мере 7,5; и

где указанная коллекция антител или их функциональных фрагментов содержит по меньшей мере две различные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи,

где указанная белковая последовательность эмбрионального типа кодируется генной последовательностью эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях указанные генные последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи присутствует в концентрации по меньшей мере 0,5% в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях указанная коллекция антител или их функциональных фрагментов содержит по меньшей мере пять различных белковых последовательностей эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат человеческие последовательности. В некоторых воплощениях указанные генные последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи присутствует в концентрации по меньшей мере 5,0% в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат одну или более определяющих комплементарность областей,

содержащих белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участок FR4, выбранный из группы, состоящей из JH4, Jк1 и JA2/3. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты также содержат диверсифицированный участок HCDR3. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты также содержат диверсифицированный участок LCDR3. В некоторых воплощениях коллекция содержит 1×10^4 антител или их функциональных фрагментов.

В некоторых воплощениях указанные белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из: IGHV3-23; IGHV3-30; IGHV4-39; IGHV4-34; IGHV4-59; IGHV1-69; IGHV5-51; IGHV3-7; IGHV1-18; IGHV3-48; IGHV3-15; IGHV3-21; IGHV1-2; IGHV3-33; IGHV4-31; IGHV3-53; IGHV3-11; IGHV3-9; IGHV4-4; IGHV1-46; IGHV3-74; IGHV1-24; IGHV4-61; IGHV1-8; IGHV1-3; IGHV3-49; IGHV3-43; IGHV4-28; IGHV3-64nlGHV7-81.

В некоторых воплощениях белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области к-легкой цепи выбраны из группы, состоящей из: IGKV3-20; IGKV1-39/1D-39; IGKV1-5; IGKV3-15; IGKV4-1; IGKV3-11; IGKV2-28/2D-28; IGKV1-33/1D-33; IGKV2-30; IGKV1-9; IGKV1-17; IGKV1-27; IGKV1-8; IGKV1-16; IGKV1-6; IGKV1-12; IGKV2D-29; IGKV1-13; IGKV1D-8 и IGKV2-24.

В некоторых воплощениях белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области λ-легкой цепи выбраны из группы, состоящей из: IGLV2-14; IGLV1-40; IGLV1-44; IGLV1-51; IGLV2-23; IGLV3-21; IGLV1-47; IGLV3-1; IGLV2-11; IGLV2-8; IGLV6-57; IGLV3-25; IGLV7-46; IGLV1-36; IGLV7-43; IGLV9-49; IGLV4-69; IGLV2-18; IGLV3-10 и IGLV3-27.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ получения описанных коллекций синтетических антител или их функциональных фрагментов. В некоторых воплощениях стадии получения дополнительно включают создание коллекции антител или их функциональных фрагментов, содержащих каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи,

где указанные каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и каркасные участки вариабельной области легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа,

где указанная пара белков эмбрионального типа обладает следующими свойствами:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs;

2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;

3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и

6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C;

где указанная коллекция антител или их функциональных фрагментов содержит по

меньшей мере две различные пары белков эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях стадия получения дополнительно включает стадии:

а) получения данных о парах генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующих в иммунном репертуаре человека;

б) идентификации пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, обладающих следующими свойствами:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fabs;

2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab pMx11_FH VH1-69 VLA_VI1-40 AYA;

3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR3080; и

6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C; и

в) создание коллекции антител или их функциональных фрагментов, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи пар белков эмбрионального типа, идентифицированных на стадии (б).

В некоторых воплощениях стадия (б) дополнительно включает стадии:

(ба) идентификации пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующих в концентрации по меньшей мере 0,05% в иммунном репертуаре человека;

бб) создания антител или их функциональных фрагментов, содержащих пары белков эмбрионального типа, идентифицированные на стадии (ба); и

бв) оценки следующих свойств указанной пары белков эмбрионального типа:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате;

2) уровень экспрессии в Fab-формате;

3) термостабильность при 60°C или более в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в IgG-формате; и

6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

В некоторых воплощениях стадия (а) дополнительно включает следующие стадии:

аа) выделение человеческих B-клеток из образца;

аб) получение кДНК из B-клеток;

ав) ПЦР-амплификация кДНК из B-клеток;

аг) секвенирование ПЦР-продуктов;

ад) идентификация генов эмбрионального типа из каждого ПЦР-продукта. В некоторых воплощениях стадия создания коллекции дополнительно включает следующие стадии;.

ва) синтез нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их функциональные фрагменты;

вб) клонирование нуклеиновых кислот в вектор;

вв) экспрессирование антител или их функциональных фрагментов. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,05% в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,23% в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,51% в иммунном репертуаре человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,07% в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,52% в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,88% в иммунном репертуаре интактного человека. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат человеческие последовательности. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере семнадцати различных пар белков эмбрионального типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат одну или более определяющих комплементарность областей, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа.

В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участок FR4, выбранный из группы, состоящей из JH4, Jк1 и JA2/3. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок HCDR3. В некоторых воплощениях антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок LCDR3. В некоторых воплощениях коллекция содержит 1×10^4 антител или их функциональных фрагментов.

В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 60% выбранных Fabs. В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA. В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют термостабильность при 70°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате. В некоторых воплощениях указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с MOR03080.

В некоторых воплощениях каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, выбранной из группы, состоящей из: IGHV3-23/IGKV1-5; IGHV3-23/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV3-15; IGHV3-23/IGKV3-15; IGHV4-59/IGKV1-39/1D-39; IGHV4-39/IGKV1-39/1D-39; IGHV4-59/IGKV3-20; IGHV1-18/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV1-5; IGHV1-69/IGKV1-39/1D-39; IGHV5-51/IGLV1-40; IGHV3-23/IGKV4-1; IGHV4-39/IGKV3-20; IGHV3-23/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-21; IGHV3-23/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-30/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-30/IGKV3-11; IGHV1-69/IGKV3-20; IGHV3-48/IGKV3-20; IGHV1-2/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV4-1; IGHV5-51/IGLV2-14; IGHV4-

59/IGKV4-1; IGHV5-51/IGKV3-20; IGHV3-7/IGKV1-39/1D-39; IGHV3-7/IGKV1-5; IGHV3-15/IGKV3-20; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV2-8; IGHV3-23/IGKV3-11; IGHV3-30/IGKV1-5; IGHV3-30/IGKV3-15; IGHV3-21/IGKV1-5; IGHV3-21/IGKV3-15; IGHV3-30/IGLV1-51; IGHV3-21/IGLV1-51; IGHV3-53/IGLV1-44; IGHV4-59/IGKV3-15; IGHV5-51/IGKV4-1; IGHV1-69/IGKV4-1 и IGHV1-69/IGKV3-11.

В некоторых аспектах указанные функциональные фрагменты указанных антител выбраны из группы, состоящей из Fab, F(ab')2, Fab', Fv и scFv.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную или лидерную последовательность, содержащую С-концевой сайт рестрикции. В некоторых воплощениях сайт рестрикции представляет собой NheI. В некоторых воплощениях сигнальная или лидерная последовательность содержит phoA или лидерную последовательность тяжелой цепи человека. В некоторых воплощениях сайт рестрикции представляет собой NdeI. В некоторых воплощениях сигнальная последовательность содержит ompA или лидерную последовательность каппа-цепи человека.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает вектор, содержащий нуклеиновые кислоты, кодирующие сигнальную или лидерную последовательность, содержащую С-концевой сайт рестрикции. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает клетку-хозяина, содержащую вектор. В некоторых воплощениях клетка-хозяин является прокариотической или эукариотической. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой клетку E.coli. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает выделенное антитело или его функциональный фрагмент, содержащие FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа,

где указанная пара белков эмбрионального типа выбрана из группы, состоящей из: IGHV3-23/IGKV1-5; IGHV3-23/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV3-15; IGHV3-23/IGKV3-15; IGHV4-39/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-18/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV3-20; IGHV4-39/IGKV1-5; IGHV1-69/IGKV1-39/1D-39; IGHV5-51/IGLV1-40; IGHV4-39/IGKV3-20; IGHV3-23/IGLV2-14; IGHV4-39/IGLV3-21; IGHV3-23/IGKV1-39/1 D-39; IGHV3-30/IGKV1-39/1D-39; IGHV1-69/IGKV3-20; IGHV3-48/IGKV3-20; IGHV1-2/IGKV3-20; IGHV3-30/IGKV4-1; IGHV5-51/IGLV2-14; IGHV5-51/IGKV3-20; IGHV3-7/IGKV1-39/1 D-39; IGHV3-7/IGKV1-5; IGHV3-15/IGKV3-20; IGHV4-39/IGLV2-14; IGHV3-23/IGKV3-11; IGHV3-30/IGKV1-5; IGHV3-30/IGKV3-15; IGHV3-21/IGKV1-5; IGHV3-21/IGKV3-15; IGHV3-30/IGLV1-51; IGHV3-21/IGLV1-51 и IGHV1-69/I.

В одном аспекте в настоящем описании описаны коллекции антител, содержащие каркасные участки вариабельной области тяжелой и легкой цепи, содержащие последовательности эмбрионального типа, конкретно FR1.

Ожидается, что имеющиеся каркасные участки эмбрионального типа снижают риск иммуногенности антител при введении пациентам. Сайты рестрикции, однако, должны использоваться для того, чтобы сделать возможным стандартное клонирование нуклеиновых кислот, кодирующих коллекции антител, в дисплейные и/или экспрессирующие векторы, с тем чтоы антитела моли быть подвергнуты скринингу против иммуногенов. Раньше сайты рестрикции, используемые для клонирования, часто располагали в пределах каркасных участков, таким образом модифицируя последовательность нуклеиновой кислоты от эмбрионального типа. Для того чтобы гарантировать, что по меньшей мере каркасный участок 1 (FR1) каждого из антител

по настоящему изобретению сохраняет последовательность эмбрионального типа, в пределах FR1 не должно быть никаких неприродных сайтов рестрикции. Поэтому аспект настоящего изобретения относится к включению сайта рестрикции в пределах С-конца прокариотических сигнальных последовательностей и человеческой лидерной последовательности, конкретно, в пределах трех С-концевых остатков. Кроме того, сигнальная последовательность и лидерная последовательность, содержащие сайт рестрикции, должны быть функциональными и обеспечивать хорошие уровни экспонирования и экспрессии антител или их фрагментов как в прокариотических системах экспрессии, так и в системах экспрессии у млекопитающих.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную или лидерную последовательность, содержащую С-концевой сайт рестрикции. В некоторых воплощениях сайт рестрикции представляет собой NheI или NdeI. В некоторых воплощениях сигнальная или лидерная последовательность содержит phoA или лидерную последовательность тяжелой цепи человека. В некоторых воплощениях сигнальная или лидерная последовательность содержит ompA или лидерную последовательность каппа-цепи человека. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную или лидерную последовательность, содержащую С-концевой сайт рестрикции. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает клетку-хозяина, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную или лидерную последовательность, содержащую С-концевой сайт рестрикции, или вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную или лидерную последовательность, содержащую С-концевой сайт рестрикции. В некоторых воплощениях клетка-хозяин является прокариотической, например E.coli, или эукариотической, например, клеткой млекопитающего.

Настоящее описание является первым описанием, в котором раскрыта концепция, что пары класса VH и VL, которые являются наиболее распространенными в иммунном репертуаре интактного человека, по-видимому, имеют предпочтительные характеристики, такие как большая стабильность и более низкая иммуногенность. Настоящее описание также является первым описанием, которое включает эту концепцию в конструирование коллекции и использует полный синтез гена для получения таких коллекций. Настоящее описание обеспечивает способы идентификации пар класса VH и VL в "наивных" и "обученных" антигеном иммунных репертуарах человека, определения пар класса VH и VL, которые являются наиболее распространенными, и затем создания коллекций, содержащих эти пары класса VH и VL. Более конкретно, коллекции по настоящему изобретению содержат наиболее распространенные и/или предпочтительные пары класса VH и VL с высоко диверсифицированными CDRs. Эта стратегия увеличивает вероятность того, что коллекции содержат антитела или их фрагменты против любого иммуногена, которые являются стабильными, имеют низкую иммуногенность и высокую аффинность в отношении специфического антигена. Результат состоит в резко повышенной вероятности, что коллекции содержат высокоэффективные антитела или их фрагменты против любого иммуногена, которые можно использовать для терапевтических или диагностических целей.

Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот (или их выбранная часть), кодирующие антитела или их фрагменты, полученные из "наивных" В-клеток их хозяев-людей, можно секвенировать. Из этих данных о последовательностях можно идентифицировать спаривания цепей класса VH/VL семейства эмбрионального типа, представленные в иммунном репертуаре. На основании определенных критериев, таких

как распространенность и/или предпочтительные биофизические свойства, выбирают пары классов тяжелых и легких цепей для включения в коллекции. Коллекции затем можно синтезировать посредством генного синтеза. В некоторых воплощениях синтетические коллекции содержат по существу каркасные участки VH и VL эмбрионального типа, где CDRs диверсифицированы, или только один CDR из VH и/или VL диверсифицирован.

С использованием последовательностей ДНК, полученных из "наивных" B-клеток хозяев-людей в качестве "матрицы", настоящее описание предоставляет способы идентификации наиболее распространенных пар VH и VL. После того, как была выявлена относительная распространенность спариваний класса VH и VL, может быть получена высокоразнообразная коллекция антител или их фрагментов, содержащих наиболее распространенные и/или предпочтительные спаривания класса VH и VL. Используя эту информацию, специалист может создать высокую степень разнообразия без потери ключевых преимуществ, присущих наиболее распространенным и/или предпочтительным комбинациям пар класса VH и VL. До настоящего изобретения никто не выявлял наиболее распространенные и/или предпочтительные пары класса VH и VL или не пытался использовать эти знания в методах создания библиотеки. Поэтому такой подход обеспечивает исчерпывающие коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, которые представляют иммунную систему интактного человека.

Используя способы конструирования и экспонирования коллекции, описанные в данной заявке, можно создавать коллекции с огромным разнообразием, так как некоторые воплощения включают коллекции по меньшей мере 1×10^{10} членов.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает векторы и клетки-хозяева, содержащие описанные коллекции нуклеиновых кислот.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способы получения таких коллекций.

В некоторых воплощениях "наивные" последовательности ДНК, типичные для иммунного репертуара человека, получают на отдельной стадии и хранят в базе данных; поэтому конструкцию коллекции можно легко модифицировать, оптимизировать и адаптировать к требованиям заказчика in silico (с помощью компьютерного моделирования), учитывая уровень соответствия требованиям заказчика, который обычно может быть реализован в синтетической библиотеке.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способы идентификации антител или их фрагментов с использованием описанных коллекций.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к коллекциям или библиотекам, кодирующим антитела или их фрагменты, содержащим белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа, которые являются наиболее распространенными и/или предпочтительными в иммунном репертуаре. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их фрагменты, являются эмбриональными, по существу эмбриональными или их кодон-оптимизированными вариантами. Такие коллекции или библиотеки могут содержать семейства и/или гены VH и VL эмбрионального типа, имеющие предпочтительные биофизические свойства, включая высокое экспонирование на фаге; высокую экспрессию в E.coli в Fab-формате; высокую экспрессию в клетках млекопитающих в IgG-формате; высокую термостабильность;

стабильность в сыворотке; низкую тенденцию к агрегации (т.е. высокую растворимость); и низкий риск иммуногенности. В некоторых воплощениях коллекции

или библиотеки могут содержать семейства и/или гены VH и VL эмбрионального типа, существующие в иммунном репертуаре интактного человека. Родственные воплощения включают способы получения и применения таких коллекций.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к коллекциям или библиотекам, кодирующим антитела или их фрагменты, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа, наиболее распространенными и/или предпочтительными в иммунном репертуаре наряду с парами класса VH/VL, наиболее распространенными и/или предпочтительными в иммунном репертуаре. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их фрагменты, являются эмбриональными, по существу эмбриональными или их кодон-оптимизированными вариантами. Такие коллекции или библиотеки могут содержать белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа и/или парами класса VH/VL, имеющими предпочтительные биофизические свойства, включая высокое экспонирование на фаге; высокую экспрессию в E.coli в Fab-формате; высокую экспрессию в клетках млекопитающих в IgG-формате; высокую термостабильность; стабильность в сыворотке; низкую тенденцию к агрегации (т.е. высокую растворимость); и низкий риск иммуногенности. В некоторых воплощениях коллекции или библиотеки могут содержать белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа и/или парами класса VH/VL, которые существуют в иммунном репертуаре интактного человека. Родственные воплощения включают способы получения и применения таких коллекций.

Соответственно, настоящее изобретение включает коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, по существу типичные для иммунного репертуара, где каждое антитело или его фрагмент содержит пару класса VH/VL, где пара класса VH/VL, по существу типичная для иммунного репертуара, является такой, что каждая пара класса VH/VL, присутствующая в коллекции, представляет собой пару класса VH/VL, присутствующую в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре. Иммунный репертуар может принадлежать индивидууму или популяции, и может быть "наивным". Такой иммунный репертуар можно определить как иммунный репертуар из пар класса VH/VL по меньшей мере в 1×10^5 B-клеток от индивидуума; пар класса VH/VL по меньшей мере в 1×10^5 B-клеток из популяции индивидуумов; или пар класса VH/VL, присутствующих по меньшей мере в 1×10^5 антител, например. Иммунный репертуар может представлять собой иммунный репертуар "наивных" B-клеток или "обученных" антигеном B-клеток. Индивидуум или популяция может представлять собой человека или быть человеческой. Иммунный репертуар можно определить путем анализа общедоступной базы данных и/или литературы.

В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их фрагменты, являются синтетическими, такими как полученные посредством полного синтеза генов. В родственных воплощениях нуклеиновые кислоты представляют собой последовательности эмбрионального типа; по существу последовательности эмбрионального типа; или кодон-оптимизированные варианты эмбрионального типа или по существу последовательности эмбрионального типа. В некоторых воплощениях по меньшей мере один из CDRs является высоко диверсифицированным.

В некоторых воплощениях коллекция по настоящему изобретению содержит антитела

или их фрагменты, где FR1, FR2 и FR3 и из VH, и из VL содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар класса VH и VL, имеющих предпочтительные характеристики. Наиболее предпочтительно, коллекция по настоящему изобретению содержит антитела или их фрагменты, где FR1, FR2 и FR3 и из VH, и из VL содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар класса VH и VL, имеющих предпочтительные характеристики, где CDR3 и из VH, и из VL являются высоко диверсифицированными.

В родственных воплощениях коллекцию указанных нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, клонируют в вектор. Подходящие векторы известны в данной области техники и включают дисплейные векторы, такие как фаговые дисплейные векторы, плазмидные векторы, фагмидные векторы, экспрессирующие векторы, включая бактериальный экспрессирующий вектор или экспрессирующий вектор млекопитающего. В другом родственном воплощении коллекцию или коллекцию, клонированную в векторы, трансформируют в клетки-хозяева. Таким образом, изобретение включает коллекцию клеток-хозяев. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические клетки-хозяева (такие как E.coli) и эукариотические клетки-хозяева (такие как клетки-хозяева млекопитающих).

В другом воплощении изобретение представляет собой базу данных, содержащую пары класса VH/VL из примерно 1345 "наивных" человеческих B-клеток или из общедоступных последовательностей на читаемом носителе. Такая база данных полезна для разработки и конструирования коллекции и библиотек по изобретению.

Изобретение также включает способы получения коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, по существу типичные для иммунного репертуара. Иммунный репертуар может представлять собой иммунный репертуар "наивных" B-клеток или "обученных" антигеном B-клеток человека или людей. Такой способ может включать следующие стадии: (а) идентификацию пар класса VH/VL, присутствующих в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре; (б) синтез коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH/VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре.

Стадию идентификации можно осуществлять различными путями. Например, идентификация пар класса VH/VL может включать выделение "наивных" B-клеток от одного или более хозяев-людей и определение пар класса VH/VL в каждой B-клетке путем выделения и секвенирования ДНК, мРНК или кДНК, кодирующих пары класса VH/VL, или путем зондирования с помощью одного или более нуклеиновокислотных зондов, специфичных к каждому VH и VL, и затем анализа пар класса VH/VL. В альтернативном или дополнительном воплощении пары класса VH/VL могут быть определены из уже существующих баз данных, таких как базы данных по последовательностям антител. В альтернативном или дополнительном воплощении пары класса VH/VL могут быть идентифицированы из литературы. Таким образом, в одном воплощении изобретение включает получение нуклеиновокислотных последовательностей антител (либо уже существующих, либо полученных de novo), определение пар класса VH/VL посредством выравнивания последовательностей и сопоставление таких последовательностей для идентификации пар класса VH/VL, присутствующих в иммунном репертуаре.

В некоторых воплощениях способ используют для создания коллекций, в которых большинство членов имеет предпочтительные биофизические свойства, которые

облегчают продукцию и экспрессию антител или их фрагментов (например, на фаге или из клеток) и дают растворимые и термостабильные антитела. Более конкретно, такие свойства включают: (1) эффективное экспонирование на фаге; (2) эффективное экспонирование на клетках млекопитающих (3) значительную экспрессию в E.coli в Fab-формате;

(4) значительную экспрессию в клетках млекопитающих в IgG-формате; (5) термостабильность; (6) растворимость; и (7) низкую иммуногенность. Посредством определения пар класса VH/VL, имеющих некоторые или все эти свойства, можно затем конструировать коллекцию, в которой большинство членов имеет такие биофизические свойства, например, посредством синтеза только нуклеиновых кислот с такими свойствами. Соответственно, изобретение включает такую коллекцию и способы получения такой коллекции.

В некоторых воплощениях синтезированные нуклеиновые кислоты являются эмбриональными, по существу эмбриональными или их кодон- оптимизированными вариантами. Изменение можно вводить по меньшей мере в один участок, определяющий комплементарность (CDR). Любой CDR является подходящим, особенно CDR3. Предпочтительно, изменение последовательности, добавленное в CDR, ограничивается последовательностями в рамке считывания и свободно от цистеинов и стоп-кодонов, обеспечивая таким образом правильную экспрессию всех членов библиотеки.

После того, как нуклеиновые кислоты были синтезированы, их можно клонировать в вектор (такой как дисплейный вектор, фаговый дисплейный вектор; фагмидовый вектор; или экспрессирующий вектор млекопитающих) и можно трансформировать в клетку-хозяина. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические клетки-хозяева (например, E.coli) и эукариотические клетки-хозяева (например, клетки-хозяева млекопитающих).

В других воплощених в изобретении предложены способы идентификации антител, специфических в отношении иммуногена. Такие способы могут включать в одном воплощении идентификацию пар класса VH/VL, присутствующих в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре;

синтез коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH/VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре; экспонирование или экспрессирование антитела или его фрагмента из коллекции; скрининг коллекции против специфического иммуногена; и выбор по меньшей мере одного антитела или его фрагмента, специфического в отношении указанного иммуногена. Поскольку способы и коллекции по изобретению можно конструировать с учетом предпочтительных биофизических свойств, настоящее изобретение особенно полезно для идентификации антитела или фрагмента антитела для лечения заболевания или состояния посредством создания коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты с такими предпочтительными свойствами, и скрининга против специфического иммуногена для идентификации антител, связывающихся с таким иммуногеном.

В некоторых аспектах изобретение относится к коллекциям или библиотекам антител или их фрагментов, содержащих пары VH/VL. В некоторых воплощениях коллекции или библиотеки антител или их фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа, которые распространены в иммунном репертуаре. В некоторых воплощениях

изобретение относится к коллекциям или библиотекам антител или их фрагментам, содержащим белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа, имеющими определенные предпочтительные биофизические характеристики. В некоторых воплощениях семейства и/или гены VH и VL эмбрионального типа являются такими, которые встречаются в природе в иммунном репертуаре и находятся среди наиболее многочисленных и распространенных в репертуаре. В некоторых воплощениях коллекции или библиотеки антител или их фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа. В некоторых воплощениях коллекции или библиотеки антител или их фрагментов содержат каркасные участки и/или участки CDR из эмбриональных, по существу эмбриональных или кодон-оптимизированных семейств и/или генов VH и VL. В некоторых воплощениях коллекции или библиотеки антител или их фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа, которые являются синтетическими, сконструированными посредством тотального генного синтеза. В некоторых воплощениях коллекции или библиотеки антител или их фрагментов содержат участки семейств и/или генов VH и VL эмбрионального типа, которые являются синтетическими, сконструированными посредством тотального генного синтеза. В некоторых воплощениях коллекции или библиотеки антител или их фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами VH и VL эмбрионального типа, имеющими предпочтительные биофизические свойства, которые облегчают скрининг и дальнейшую разработку антител, особенно в терапевтическом контексте. Предпочтительные биофизические свойства включают, но не ограничиваются этим, то, что: (1) они хорошо экспонируются на фаге в Fab-формате, (2) они хорошо экспонируются на клетках млекопитающих в IgG-формате (3) они экспрессируются в высоких количествах в Fab-формате, например, в E.coli, и IgG-форматах, например, в клетках млекопитающих, (4) являются термодинамически стабильными; (5) имеют высокую стабильность в сыворотке, (6) имеют низкую тенденцию к агрегации (т.е. высокую растворимость); и (7) имеют низкий риск иммуногенности.

В других аспектах коллекции по настоящему изобретению содержат антитела или их фрагменты, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа предпочтительных пар класса VH и VL. Коллекции по настоящему изобретению предпочтительно содержат антитела или их фрагменты, где один или более каркасных участков содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые парами класса VH и VL, имеющими предпочтительные характеристики, особенно где FR1, FR2 и FR3 и из VH, и из VL содержат белковые последовательности эмбрионального типа пар класса VH и VL, имеющих предпочтительные характеристики. CDRs могут быть высоко диверсифицированы. Предпочтительно, CDR3 и из VH, и из VL являются высоко диверсифицированными. В некоторых воплощениях CDR1 и CDR2 из VH и/или VL являются эмбриональными или по существу эмбриональными по последовательности.

Эта стратегия увеличивает вероятность того, что коллекции по настоящему изобретению содержат антитела или их фрагменты против любого иммуногена, которые могут разрабатываться для терапевтического применения, поскольку большинство антител или их фрагментов, присутствующих в коллекциях, содержат последовательности эмбрионального типа пар VH и VL, имеющих упомянутые выше предпочтительные характеристики. Выбранные антитела также будут иметь низкую

иммуногенность и высокую аффинность к специфическому антигену. Результат заключается в существенно увеличенной вероятности того, что антитела или их фрагменты, которые селектированы из описанных коллекций, являются высоко эффективными против любого иммуногена и могут разрабатываться для терапевтических или диагностических целей.

Такие коллекции преодолевают многие проблемы из предшествующего уровня техники. Например, в когнатной библиотеке, происходящей из В-кпеток, спаривания класса VH и VL, присутствующие в библиотеке, зависят от спариваний класса, присутствующих в образце. Если взять достаточно большой образец В-клеток, то будет присутствовать каждая из комбинаций спариваний класса приблизительно 50 VH и 50 VL (примерно 2500). Присутствие такого количества пар класса VH и VL может быть сравнимо с фоновым шумом. Может быть желательным создание библиотек с большим разнообразием, содержащих только самые распространенные пары класса VH и VL, но, учитывая когнатный характер библиотеки, это не возможно.

В дополнение к этому, в некоторых воплощениях последовательности ДНК, на которых основаны коллекции, получены их образцов "наивных" В-клеток, которые "не обучены" антигеном, поэтому экспрессирующиеся члены не смещены в сторону конкретного иммуногена, и данные коллекции могут быть использованы для скрининга против любого иммуногена.

Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот (или их выбранный участок), кодирующие антитела или их фрагменты, полученные из "наивных" ("необученных" антигеном) В-клеток от хозяев-людей, можно секвенировать. Из этих данных о последовательностях можно идентифицировать спаривания класса VH/VL цепей семейства эмбрионального типа, преимущественно представленные в иммунном репертуаре. На основании определенных критериев, таких как распространенность, можно выбрать пары класса тяжелых и легких цепей для включения в коллекции. Затем коллекции можно синтезировать посредством генного синтеза. В некоторых воплощениях синтетические коллекции содержат по существу каркасные участки VH и VL эмбрионального типа, где CDRs диверсифицированы.

С использованием последовательностей ДНК, полученных, например, из "наивных" ("необученных" антигеном) В-клеток от хозяев-людей или из общедоступных баз данных или литературы в качестве "матрицы", в настоящем описании предложены способы идентификации наиболее распространенных семейств и/или генов и/или пар класса VH и VL эмбрионального типа. Как только была выявлена относительная распространенность семейств и/или генов и/или пар класса VH и VL эмбрионального типа, антитела или их фрагменты, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами и/или генами и/или парами класса VH и VL эмбрионального типа, можно протестировать в отношении следующих предпочтительных характеристик: (1) они хорошо экспонируются на фаге в Fab-формате, (2) они экспрессируются в высоких количествах и в растворенной форме в Fab-формате и IgG-форматах, (3) и они термодинамически стабильны. Посредством тестирования белковых последовательностей эмбрионального типа, кодируемых наиболее распространенными семействами и/или генами и/или парами класса VH и VL эмбрионального типа, можно идентифицировать те из них, которые имеют предпочтительные характеристики. Используя эту информацию, специалист может создать высокую степень разнообразия без ухудшения ключевых преимуществ, относящихся к наиболее распространенным комбинациям семейств и/или генов и/или пар класса VH и VL эмбрионального типа.

Используя способы конструирования и экспонирования коллекции, описанные в данной заявке, можно создать коллекции с большим разнообразием, поскольку некоторые воплощения включают коллекции из по меньшей мере 1×10^{10} членов.

Настоящее описание относится в основном к коллекциям синтетических антител, содержащим пары класса VH и VL, имеющие наиболее предпочтительные характеристики. В некоторых воплощениях коллекции содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами VH и VL, представленными парой данного класса.

Настоящее описание относится в основном к коллекциям синтетических антител, содержащих одну или более пар класса VH и VL, имеющим предпочтительные характеристики. В некоторых аспектах коллекции содержат белковые последовательности эмбрионального типа, кодируемые семействами VH и VL, представленными парой класса.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложены способы идентификации генов VH и VL эмбрионального типа, которые являются наиболее распространенными в иммунном репертуаре, тестирования антител, имеющих последовательности наиболее распространенных генов VH и VL эмбрионального типа для идентификации генов VH и VL эмбрионального типа, имеющих предпочтительные характеристики, и затем создания коллекций, содержащих предпочтительные классы VH и VL. В настоящем описании предложены способы идентификации пар класса VH и VL в иммунном репертуаре человека, который может быть интактным, определения пар класса VH и VL, которые являются наиболее распространенными, тестирования пар класса VH и VL для идентификации пар класса VH и VL, имеющих предпочтительные характеристики, и затем создания коллекций, содержащих предпочтительные пары класса VH и VL и/или антитела, происходящие из предпочтительных генов VH и VL эмбрионального типа. Как только VH и VL и/или пары класса VH и VL идентифицированы, определяют их соответствующие последовательности эмбрионального типа, так что последовательности эмбрионального типа могут быть включены в конструируемую коллекцию.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложены векторы и клетки-хозяева, содержащие описанные коллекции нуклеиновых кислот.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложены способы получения таких коллекций.

В некоторых воплощениях последовательности ДНК, представляющие иммунный репертуар человека, получают на отдельной стадии и хранят в базе данных; поэтому конструкцию коллекции можно легко модифицировать, оптимизировать и адаптировать к требованиям заказчика in silica (с помощью компьютерного моделирования), учитывая уровень соответствия требованиям заказчика, который обычно может быть реализован в синтетической библиотеке.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложены способы идентификации антител или их фрагментов с использованием описанных коллекций.

Способы, нуклеиновые кислоты, белки, вектор, клетка-хозяин

В одном аспекте в настоящем описании предложены коллекции нуклеиновых кислот, полученных посредством тотального синтеза генов. Технология генного синтеза значительно продвинулась в последние годы и можно создавать очень большие коллекции нуклеиновых кислот.Следующие компании предлагают услуги по такому синтезу: Entelechon (Regensburg, Германия), Geneart (Regensburg, Германия) и Sloning Biotechnology (Puchheim, Германия). Для создания коллекции компанией генного синтеза

могут быть представлены последовательности каждого члена коллекции.

В некоторых воплощениях в настоящем описании предложены коллекцию синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащую пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 B-клеток. В другом воплощении коллекции по настоящему изобретению содержат пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 1% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 B-клеток. В другом воплощении коллекции по настоящему изобретению содержат пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 1,5% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 B-клеток. В другом воплощении коллекции по настоящему изобретению содержат пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 2% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 B-клеток. В другом воплощении коллекции по настоящему изобретению содержат пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 3% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 B-клеток. В другом воплощении коллекции по настоящему изобретению содержат пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 4% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 B-клеток. В другом воплощении коллекции по настоящему изобретению содержат пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 5% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 B-клеток.

В некоторых воплощениях в настоящем описании предложены коллекции, где пары класса VH и VL идентифицированы в B-клетках, выделенных из человеческого организма. В некоторых воплощениях B-клетки являются "наивными". В некоторых воплощениях коллекции нуклеиновых кислот кодируют антитела или их фрагменты, содержащие каркасные участки VH и VL эмбрионального типа. В предпочтительном воплощении коллекции нуклеиновых кислот синтезируют с включением каркасных участков VH и VL эмбрионального типа с диверсифицированными CDRs. Каркасные участки эмбрионального типа желательны, поскольку антитела или их фрагменты, содержащие каркасные участки эмбрионального типа, вероятно, не являются иммуногенными.

Используя способы конструирования и экспонирования коллекции, описанные в данной заявке, можно получать коллекции с большим разнообразием, поскольку некоторые воплощения включают коллекции из по меньшей мере 1×10^4 последовательностей нуклеиновых кислот, некоторые воплощения включают коллекции из по меньшей мере 1×10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11} или 10^{12} последовательностей нуклеиновых кислот.Такое разнообразие получают посредством синтеза коллекций, содержащих члены, содержащие распространенные пары класса VH и VL с диверсифицированными CDRs.

Коллекции по настоящему изобретению сконструированы на основании данных о последовательностях, по существу представляющих иммунный репертуар. В некоторых воплощениях данные о последовательностях получают посредством поиска общедоступных перечней последовательностей иммуноглобулинов. Например, можно осуществлять поиск в NCBI, используя Ig-Blast, или в общедоступной литературе.

Начиная с 2005 г., база данных содержала по меньшей мере 25000 перегруппированных последовательностей человеческих антител в FASTA формате. Из 22500 элементов, 13235 представляли последовательности VH, 1506 представляли Vк, и 2259 представляли Vλ. Последовательности VH, Vк и Vλ можно классифицировать в соответствующие семейства и/или гены эмбрионального типа. Поскольку некоторые из Ig-Blast включают последовательности целых антител, из базы данных по последовательностям можно определить точные семейства и/или гены эмбрионального типа для каждого из спариваний доменов класса VH и VL. При использовании этого подхода, значение каждого семейства и/или гена VH и VL эмбрионального типа, и/или семейства и/или гена каждой пары доменов класса VH и VL эмбрионального типа может быть легко определено специалистом в данной области. Выбор, какой из VH и VL и/или какую из пар класса VH и VL включить в библиотеку, можно осуществлять различными способами. В некоторых воплощениях для включения в коллекцию или библиотеку выбирают VH и VL с наибольшей распространенностью. В некоторых воплощениях VH и VL, имеющие предпочтительные биофизические свойства, выбирают для включения в коллекцию или библиотеку. В некоторых воплощениях пары класса VH и VL, имеющие наибольшую распространенность, выбирают для включения в коллекцию или библиотеку. В некоторых воплощениях пары класса VH и VL, имеющие предпочтительные биофизические свойства, выбирают для включения в коллекцию или библиотеку. В некоторых воплощениях и VH, и VL, имеющие наибольшую распространенность и/или предпочтительные биофизические свойства, и/или пары класса VH и VL, имеющие наибольшую распространенность, и/или пары класса VH и VL, имеющие предпочтительные биофизические свойства, выбирают для включения в коллекцию или библиотеку.

Одним из. недостатков такого подхода является то, что общедоступные базы данных часто наполнены последовательностями антител, полученных против специфических иммуногенов, поэтому последовательности имеют отклонения. Кроме того, в большинстве баз данных последовательности тяжелой и легкой цепи не связаны, поэтому спаривание класса VH и VL не может быть идентифицировано.

В некоторых воплощениях последовательности нуклеиновых кислот получены путем сбора В-клеток от одного или более хозяев; выделения ДНК из В-клеток и предпочтительно секвенирования ДНК. Предпочтительно, В-клетки являются "наивными". Образцы из В-клеток собирают от одного или более людей-доноров. Ниже приведен метод, который может быть использован для выделения В-клеток. В-лимфоциты в состоянии покоя (В-клетки) выделяют из селезенки, используя отрицательный отбор против других типов клеток с помощью моноклональных антител анти-CD43 и анти-Mac-1/CDHb, например, с помощью магнитных микрогранул. Эта стратегия истощает не В-клетки из смешанной популяции спленоцитов и основана на том факте, что большинство зрелых лейкоцитов, за исключением покоящихся В-клеток селезенки, экспрессируют CD43 (в действительности, экспрессия CD43 была продемонстрирована на незрелых В-клетках, плазматических клетках и некоторых зрелых клетках, в дополнение к гранулоцитам, моноцитам, макрофагам, тромбоцитам, клеткам естественным киллерам (NK), тимоцитам и периферическим CD8+и большинству CD4+Т-клеток). Анти-Mac-1/CD11b микрогранулы включены в отрицательную селекцию для улучшения удаления миелоидных клеток. Выделение В-клеток можно автоматизировать с использованием AutoMACS автоматизированного сортировщика клеток с помощью магнитных шариков (Miltenyi Biotec). Как оценено с помощью флуоресцентного анализа B220+клеток, такое выделение обычно дает приблизительно

4×10e7 В-клеток на селезенку с чистотой более 95%. См. также Miltenyi S, Muller W, Weichel W, and Radbruch A. (1990) Cytometry 11(2), 231-238.

Число выделенных В-клеток по существу представляет иммунный репертуар. В некоторых воплощениях по меньшей мере $1x10^4$ В-клеток выделяют из хозяина, более предпочтительно по меньшей мере 10^5 В-клеток;

более предпочтительно по меньшей мере 10^6 В-клеток; наиболее предпочтительно 10^7 В-клеток выделяют из хозяина.

ДНК, кодирующую антитела и их фрагменты из каждой В-клетки, выделяют и амплифицируют, например, тяжелые и легкие цепи связаны посредством ПЦР реакции. ДНК предпочтительно секвенируют.Секвенированная ДНК может представлять собой кДНК, полученную из мРНК В-клеток. Экстракция мРНК из эукариотических клеток, таких как В-клетки, является хорошо известной технологической процедурой. Существуют многочисленные протоколы и имеются коммерческие наборы. Такие как система выделения мРНК PolyATtract® (Promega, Madison, WI, США) или различные наборы RNeasy и Oligotex DirectmRNA (оба из Qiagen, Hilden, Германия). Во многих этих методах используют polyA-хвост эукариотических мРНК, например, посредством аффинной очистки на олиго (dT) матрицах, таких как олиго (dT) целлюлоза.

кДНК можно селективно амплифицировать из выделенной мРНК с помощью обратной транскрипции с использованием специфических праймеров, затем стандартной ПЦР. Специфические праймеры используют для амплификации нуклеиновых кислот вариабельных доменов тяжелых и легких цепей. См. Cancer Surv. 1997; 30:21-44, J Clin. Pathol. 1994; 47:493-6, J. Clin. Pathol. 1990; 43:888-90 или Mol. Pathol. 2002 April; 55(2): 98-101.

ДНК, кодирующую вариабельные домены тяжелой и легкой цепи из одной В-клетки, хранят вместе, так что можно идентифицировать спаривание вариабельных доменов класса тяжелых и легких цепей. Методы выделения нуклеиновых кислот, кодирующих спаривание вариабельных доменов из индивидуальной В-клетки, хорошо известны в данной области. См., например, WO 01/92291; WO 92/15678; WO 93/03151, WO 2005/042774; Mullinax RL et al,, 1992 Biotechniques 12:6 864-868; Chapal, N. etal. 1997 Biotechniques 23, 518-524, Embleton MJ et al., 1992 Nucleic Acids Res. 20:15, 3831-3837; Coronella, J.A. et al. 2000 Nucleic Acids Res. 28:20, E85; Thirion S et al., 1996 European Journal of Cancer Prevention 5:6 507-511; и Wang, X et al. 2000 J. Immunol. Methods 20, 217-225.

Эти методы можно использовать отдельно или в комбинации с другими методами. Например, если последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи из большого образца не идентифицированы успешно вместе с их соответствующими В-клетками, то можно выполнить следующий способ с целью идентификации точного домена пары класса вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи. Выполняют ПЦР на одной клетке (single cell PCR) для каждой отдельной В-клетки.

Предпочтительно, ДНК из каждой В-клетки секвенируют.Существуют различные компании, которые способны секвенировать полные геномы, такие как Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, MA, США). С помощью своей технологии True Single Molecule Sequencing™, Helicos способна осуществлять прямое секвенирование одиночных молекул ДНК или РНК с высокой скоростью и эффективностью. Другие компании, способные выполнять аналогичную работу по секвенированию, включают Illumina (San Diego, CA, США; система Solexa) и Roche (Basel, CH; система 454). Никаких стадий клонирования не требуется перед секвенированием.

В другом аспекте в описании предложены способы идентификации семейства

эмбрионального типа пар вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи, присутствующих в иммунном репертуаре. Все антитела или их фрагменты можно проследить до их семейства эмбрионального типа с использованием способов, известных специалисту в данной области. Анализируя последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его фрагмент, можно определить семейство эмбрионального типа как для VH, так и для VL с помощью способов, известных специалисту в данной области. Например, Wildt et. al, (1999) собирали В-клетки от 3 пациентов и идентифицировали 365 спариваний класса VH и VL. РНК из каждой В-клетки использовали для синтеза кДНК, и кДНК, кодирующую VH- и VL-области, амплифицировали с помощью ПЦР и секвенировали. Как показано на Фиг.1 Wildt, некоторые классы VH и VL спаривались чаще, чем другие, например, VH3-8 cVк3-1, Vк3-19, Vк4-1, Vλ2-3 или Vλ1-2, и VH3-9 с Vк3-1, Vк3-3 или Vλ1-5.

В другом аспекте в описании предложены способы конструирования диверсифицированных участков, определяющих комплементарность, перед синтезированием коллекции. CDRs можно конструировать способами, хорошо известными в данной области, включая описанные в Knappik et al. 2000;

В другом аспекте в описании предложены способы селекции спариваний класса вариабельных доменов, которые желательно включить в коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты. В некоторых воплощениях синтезируют коллекцию нуклеиновых кислот, содержащих все пары класса VH и VL доменов, идентифицированные описанными способами.

Кроме того, распространенность пар класса VH и VL можно определить с помощью различных статистических тестов. В самой простой форме просто подсчитывают отдельные пары класса VH и VL. Более сложные статистические тесты могут учитывать различные другие параметры. В качестве неограничивающих примеров следующие статистические тесты и ссылки могут служить руководством в качестве примеров многочисленных подходов, сделанных в таком или подобном анализе: Байесовская оценка сжатия (Bayesian Shrinkage Estimation) (см., например, Biometrics 59 (2003): 476-486), DADA (Цифровой анализ распространенности кДНК, см., например, BMC Genomics 2002, 3:7), линейное моделирование (Pacific Symposium on Biocomputing, 1999, 4:41-52) и различные методы кластеризации (BMC BMC Bioinformatics 2006, 7:397, Fourth IEEE International Conference on Data Mining (ICDM'04), pp.403-406).

В других аспектах в настоящем описании предложена коллекция векторов, содержащих коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты. В некоторых воплощениях векторы содержат экспрессирующие векторы, дисплейные векторы, фаговые дисплейные векторы или фагмидные векторы.

Эукариотические экспрессирующие векторы хорошо известны в данной области, а также имеются в продаже. Как правило, предложенные векторы содержат удобные сайты рестрикции для вставки желательной ДНК. Примеры таких векторов включают pSVL и pKSV-10, pBPV-1/PML2d и pTDT1 (ATCC, №31255).

В других аспектах в настоящем описании предложена коллекция клеток-хозяев, трансформированных описанной коллекцией векторов. Клетки-хозяева могут быть либо прокариотическими, либо эукариотическими. Бактериальные клетки представляют собой предпочтительные прокариотические клетки-хозяева и обычно представляют собой штамм Escherichia coli (E.coli), такой как, например, E.coli штамм DH5, доступный от Bethesda Research Laboratories, Inc., Bethesda, Md. Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включает клетки дрожжей и млекопитающих, в том числе мышей и грызунов, предпочтительно клетки позвоночных, такие как клетки, полученные из

клеточной линии мыши, крысы, обезьяны или человека.

Введение векторов в клетки-хозяева можно осуществить различными способами трансформации или трансфекции, известными специалистам в данной области, включая преципитацию фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, слияние с липосомами, слияние с помощью "теней" эритроцитов (RBC ghost fusion), слияние протопластов, вирусную инфекцию и тому подобное. Получение моноклональных полноразмерных антител, Fab-фрагментов, Fv-фрагментов и scFv-фрагментов хорошо известно.

Трансформацию соответствующих клеток-хозяев рекомбинантной молекулой ДНК выполняют способами, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Что касается трансформации прокариотических клеток-хозяев, см., например, Cohen et al., Proceedings National Academy of Science, USA, Vol.69, P. 2110 (1972); и Maniatis et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982). Что касается трансформации клеток позвоночных ретровирусными векторами, содержащими рДНК, см., например, Sorge et al., Mol. Cell. B/o/., 4:1730-1737 (1984); Graham et al., Virol., 52:456 (1973); и Wigler et al., Proceedings National Academy of Sciences, USA, Vol.76, P. 1373-1376 (1979).

В другом аспекте в описании предложены набор или база данных, содержащие данные о последовательностях, иллюстрирующие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их фрагменты, содержащие нуклеиновые кислоты, присутствующие в образце из по меньшей мере 1×10^5 "наивных" человеческих В-клеток, где указанные данные о последовательностях находятся на считываемом носителе.

В другом аспекте в описании предложен способ получения коллекции синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, включающий синтез коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05% пар класса VH и VL, находящихся в образце из по меньшей мере примерно 2500 В-клеток. В некоторых воплощениях в описании предложен способ получения коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, по существу представляющие иммунный репертуар, включающий: (а) идентификацию пар класса VH/VL, присутствующих в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре; (б) синтез коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH/VL в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре. В некоторых воплощениях идентификация пар класса VH/VL включает: (1) выделение В-клеток из одного или более хозяев-людей; (2) определение пар класса VH/VL в каждой В-клетке способом, выбранным из: (А) выделение и секвенирование ДНК, мРНК или кДНК, кодирующей пары класса VH/VL; или (В) исследование с помощью одного или более нуклеиновокислотных зондов, специфичных к каждому VH и VL; и (3) анализ пар класса VH/VL. В некоторых воплощениях идентификация пар класса VH/VL включает: (1) получение последовательности нуклеиновых кислот антител; (2) определение пар класса VH/VL посредством выравнивания последовательностей; (3) сопоставление таких последовательностей из по меньшей мере 100 антител для идентификации пар класса VH/VL, присутствующих в иммунном репертуаре. В некоторых воплощениях способы включают селекцию пар класса VH/VL, демонстрирующих по меньшей мере одно биофизическое свойство, выбранное из группы, состоящей из: (1) эффективного экспонирования на фаге; (2) эффективного экспонирования на клетках млекопитающих;

(3) значительной экспрессии в E.coli в Fab-формате;

(4) значительной экспрессии в клетках млекопитающих в IgG-формате; (5) термостабильности; (6) растворимости; и (7) низкой иммуногенности; и синтезирование коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, демонстрирующие по меньшей мере одно из указанных биофизических свойств. В некоторых воплощениях коллекция нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, является эмбриональной, по существу эмбриональной или кодон-оптимизированными вариантами нуклеиновых кислот эмбрионального типа. В некоторых воплощениях во время синтеза коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH/VL, изменение последовательности вводят по меньшей мере в один участок, определяющий комплементарность (CDR). В некоторых воплощениях изменение последовательности ограничивается последовательностями без стоп-кодонов. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают клонирование коллекции нуклеиновых кислот в вектор. В некоторых воплощениях вектор выбран из группы, состоящей из: (1) дисплейного вектора, (2) фагового дисплейного вектора; (3) фагмидного вектора; и (4) экспрессирующего вектора млекопитающих. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают трансформацию в клетку-хозяина. В некоторых воплощениях клетки-хозяева выбраны из группы, состоящей из: (1) прокариотических клеток-хозяев; (2) эукариотических клеток-хозяев: (3) клеток-хозяев E.coli; и (4) клеток-хозяев млекопитающих.

Некоторые воплощения также включают встраивание указанных нуклеиновых кислот в коллекцию векторов и трансформормирование/ трансфицирование клетки-хозяина и экспонирование антител или их фрагментов. В некоторых воплощениях векторы представляют собой экспрессирующие векторы, дисплейные векторы, такие как фагмидный вектор. Некоторые воплощения также включают трансфицирование указанных векторов в подходящую клетку-хозяина. В некоторых воплощениях клетка-хозяин является прокариотической, такой как E.coli, или эукариотической, такой как клетка млекопитающего.

В другом аспекте в описании предложен способ идентификации антитела или фрагментов антитела, специфических в отношении иммуногена, включающий стадии синтеза коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05% пар класса VH и VL, находящихся в образце из по меньшей мере примерно 2500 B-клеток; скрининг коллекции против специфического иммуногена; и выбор одного или более антител или их фрагментов, специфических в отношении указанного иммуногена. Некоторые воплощения включают способ идентификации антитела или фрагментов антитела, специфических в отношении иммуногена, включающий стадии: (а) идентификации пар класса VH/VL, присутствующих в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре; (б) синтеза коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH/VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре; (в) экспонирования или экспрессирования антитела или его фрагмента из коллекции; (г) скрининга коллекции против специфического иммуногена; и (г) выбора по меньшей мере одного антитела или его фрагмента, специфического в отношении указанного иммуногена. Некоторые воплощения включают способ идентификации антитела или фрагмента антитела для лечения заболевания или

состояния, включающий стадии: (а) идентификации пар класса VH/VL, присутствующих в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре; (б) идентификации пар класса VH/VL, демонстрирующих по меньшей мере одно биофизическое свойство, выбранное из группы, состоящей из: (1) эффективного экспонирования на фаге; (2) эффективного экспонирования на клетках млекопитающих; (3) значительной экспрессии в E.coli в Fab-формате; (4) значительной экспрессии в клетках млекопитающих в IgG-формате; (5) термостабильности; (6) растворимости; и (7) низкой иммуногенности; (в) синтеза коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH/VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 2% пар класса VH/VL в иммунном репертуаре и демонстрирующие по меньшей мере одно биофизическое свойство из (1) - (7); (г) экспонирования или экспрессирования антитела или его фрагмента из коллекции; (д) скрининга коллекции против специфического иммуногена, ассоциированного с данным заболеванием или состоянием; и (е) выбора по меньшей мере одного антитела или его фрагмента, специфического в отношении указанного иммуногена.

В некоторых воплощениях В-клетки выделены из хозяина-человека. В некоторых воплощениях В-клетки являются "наивными". В некоторых воплощениях пары класса VH и VL, находящиеся в образце из по меньшей мере 1 X примерно 2500 В-клеток, идентифицируют посредством способа, включающего сбор "наивных" В-клеток от одного или более хозяев-людей; выделение ДНК из собранных В-клеток; и анализ выделенной ДНК. В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК включает секвенирование ДНК. В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК дополнительно включает определение частоты, с которой каждая пара класса VH и VL находится в образце.

Некоторые воплощения также включают встраивание указанных нуклеиновых кислот в коллекцию векторов и трансформацию/трансфицирование в клетку-хозяина и экспонирование антител или их фрагментов.

В другом аспекте в описании предложен способ идентификации антитела или фрагментов антитела, специфических в отношении иммуногена, включающий стадии синтеза коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,05% пар класса VH и VL, находящихся в образце из по меньшей мере примерно 2500 В-клеток; скрининг коллекции против специфического иммуногена; и выбор одного или более антител или их фрагментов, специфических в отношении указанного иммуногена.

В некоторых воплощениях В-кпетки выделены из хозяина-человека. В некоторых воплощениях В-клетки являются "наивными". В некоторых воплощениях пары класса VH и VL в образце из по меньшей мере 2500 В-клеток определены посредством способа, включающего сбор В-клеток от одного или более хозяев-людей; выделение ДНК из собранных В-клеток; и анализ выделенной ДНК. В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК включает секвенирование ДНК. В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК дополнительно включает определение частоты, с которой каждая пара класса VH и VL находится в образце.

В некоторых воплощениях коллекция экспонируется перед тестированием/скринингом с использованием фагового, дрожжевого, рибосомального, бактериального или эукариотического дисплея. В некоторых воплощениях коллекция экспонируется на прокариотических или эукариотических клетках. В некоторых воплощениях коллекция

экспонируется в Fab- или IgG-формате или другом формате, известном специалисту в данной области техники.

Скрининг можно выполнять с использованием одного из способов, хорошо известных в данной области техники, таких как фаговый дисплей, селетивно инфекционный фаг, полисомная технология для скрининга связывания и аналитические системы для ферментативной активности или стабильности белка. Многие такие способы известны специалистам и в качестве примерных ссылок предложены следующие: Valle RP, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2003 Mar; 6(2): 197-203; Ackermann BL Expert Rev. Proteomics. 2007 Apr; 4(2):175-86; и Anderson KS J Proteome Res. 2005 Jul-Aug; 4(4):1123-33.

В одном воплощении скрининговые анализы выполняют так, что связывание лиганда антителом приводит к детектируемому сигналу, либо прямо, либо опосредованно. Такие сигналы включают, например, получение комплекса, образование продукта каталитической реакции, высвобождение или поглощение энергии и тому подобное. Клетки из популяции, подвергнутые трансформации с помощью рекомбинантной ДНК, можно клонировать с получением моноклональных колоний, например. Клетки, образующие эти колонии, можно собрать, лизировать и их ДНК содержимое исследовать на присутствие рекомбинантной ДНК с использованием способа, известного в данной области, например, как описано в Southern, J. Mol. Biol., 98:503 (1975) или Berent etal., Biotech. 3:208 (1985).

Биофизические свойства

Изобретение также включает коллекции и способы получения таких коллекций, в которых пары класса VH/VL имеют желательные биофизические свойства. Предпочтительные и желательные биофизические свойства включают более высокую стабильность, более высокий уровень экспрессии и низкую тенденцию к агрегации.

Подходящие биофизические свойства облегчают применение коллекции на различных стадиях. Например, скрининг коллекции облегчается, если антитела или их фрагменты являются растворимыми и не агрегируют, и хорошо экспрессируются при скрининге фона, такого как фаг.Дальнейшая разработка антитела, например, для тестирования на животных и терапевтических применений, облегчается такими свойствами антител, как растворимость, термостабильность, высокие уровни экспрессии (особенно в виде IgG в клетках млекопитающих) и низкая иммуногенность.

Для того чтобы все или по меньшей мере большинство антител или их фрагментов имели такие предпочтительные биофизические свойства, пары класса VH/VL могут быть подвергнуты скринингу заранее для определения того, какие пары класса демонстрируют эти свойства. Библиотеку затем конструируют посредством синтеза нуклеиновых кислот, кодирующих только антитела с такими предпочтительными биофизическими свойствами.

Конечно, не все пары класса VH/VL будут демонстрировать все биофизические свойства в равной степени, и средний специалист определит, какие свойства являются более подходящими и/или баланс каждого из свойств перед определением того, какие пары класса VH/VL следует синтезировать.

Таким образом, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена библиотека синтетических антител, подвергнутая селекции в отношении комбинаций VH/VL, которые эффективно экспонируются, например, на поверхности фага или в других дисплейных технологиях. Предпочтительно все, в основном все или по существу все комбинации VH/VL эффективно экспонируются. Эффективность экспонирования можно измерить посредством "сэндвич"-фагового ИФА, как описано в настоящем изобретении.

В других аспектах в настоящем изобретении предложена библиотека синтетических антител, подвергнутая селекции в отношении комбинаций VH-VL, которые хорошо экспрессируются в E.coli в Fab-формате. Предпочтительно все, в основном все или по существу все комбинации VH/VL хорошо экспрессируются в E coli в Fab-формате. Экспрессию в Fab-формате в E.coli можно определить количественно и она составляет предпочтительно более 2 мг/л, более 5 мг/л, более 10 мг/л или более 15 мг/л в бактериальной культуре. В некоторых аспектах все VH-VL экспрессируются на уровне более чем 2 мг/л, по существу все комбинации VH-VL экспрессируются на уровне более чем 5 мг/л, большинство комбинаций VH-VL экспрессируются на уровне более чем 10 мг/л в бактериальной культуре и/или по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять комбинаций VH-VL экспрессируются на уровне более чем 15 мг/л в бактериальный культуре.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена библиотека синтетических антител, подвергнутая селекции в отношении комбинаций VH-VL, хорошо экспрессирующихся в системе млекопитающих в IgG-формате. Подавляющее большинство терапевтических биологических препаратов на основе антител, имеющихся на рынке в настоящее время, находится в IgG-формате по многим причинам: (1) период полувыведения молекул IgG из организма человека является очень высоким (примерно 3 недели) из-за взаимодействия IgG с неонатальным рецептором (FcRn); (2) молекулы IgG являются высоко растворимыми, термодинамически стабильными и относительно устойчивыми к протеазам в крови; и (3) IgG обладают ADCC (антитело-зависимая клеточная цитотоксичность) и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность) активностью, которые требуются для элиминации опухолевых клеток. Экспрессия конкретной VL/VH-комбинации в Fab-формате не обязательно коррелирует с экспрессией той же VL/VH-комбинации в IgG-формате, и поэтому экспрессия и растворимость комбинаций VL/VH в IgG-формате также являются важными независимыми факторами.

Система млекопитающих может включать, например, суспензионную культуру млекопитающих, культуру прикрепленных клеток млекопитающих, клетки HKB11, клетки PERC.6 или клетки CHO. Предпочтительно, все, в основном все или по существу все комбинации VH/VL хорошо экспрессиются в системе млекопитающих в IgG-формате. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена библиотека синтетических человеческих антител, где все комбинации VH-VL экспрессируются на уровне более чем 10 мг/л в системе млекопитающих в IgG-формате, где по существу все комбинации VH-VL экспрессируются на уровне более чем 15 мг/л в системе млекопитающих в IgG-формате; где большинство комбинаций VH-VL экспрессируются на уровне более чем 20 мг/л в системе млекопитающих в IgG-формате; и/или по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять комбинаций VH-VL экспрессируются на уровне более чем 25 мг/л в системе млекопитающих в IgG-формате.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена библиотека синтетических антител, подвергнутая селекции в отношении комбинаций VH/VL, которые являются термостабильными. Предпочтительно, все, в основном все или по существу все комбинации являются термостабильными с Т.пл., равной по меньшей мере 68, 70, 72, 74 или 76°C. Термостабильность можно измерять, как описано в данной заявке. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена библиотека синтетических человеческих антител, где по существу все комбинации VH-VL имеют Т.пл. более 68°C; по существу все комбинации VH-VL имеют Т.пл. более 70°C или более 72°C; большинство комбинаций VH-VL имеют Т.пл. более 74°C; и/или многие комбинации VH-VL имеют Т.пл. более 76°C. В некоторых аспектах по меньшей мере три, по меньшей мере четыре

или по меньшей мере пять комбинаций VH-VL имеют Т.пл. более 70°С.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена библиотека синтетических антител, подвергнутая селекции в отношении комбинаций VH-VL, которые являются растворимыми, т.е. не склонны к агрегации. Растворимость может быть определена, например, посредством подходящего сворачивания и характеристик экспрессии тестируемого Fab в бактериальном хозяине или IgG1 в эукариотическом хозяине или агрегации после очистки, как определено посредством аналитической гель-фильтрации.

Низкая иммуногенность может быть предсказана или определена непосредственно способами, известными в данной области, а также о ней можно судить по факту, что данные пары класса VH/VL являются наиболее распространенными в репертуаре; и используемые белковые последовательности представляют собой по существу белковые последовательности эмбрионального типа.

Как описано в данной заявке, данные о последовательностях антител могут быть получены из В-клеток, например, "наивных" В-клеток, общедоступных баз данных и/или литературы. Каждую из последовательностей антител можно выравнивать относительно наиболее близкого семейства и/или гена эмбрионального типа. Из этих данных можно определить семейства и/или гены VH и VL эмбрионального типа и/или пары класса VH/VL, которые являются наиболее распространенные.

Как только определены семейства и/или гены VH и VL эмбрионального типа и/или пары класса VH/VL, которые являются наиболее распространенными, можно выбрать, какое семейство и/или гены VH и VL эмбрионального типа и/или пары класса VH/VL следует тестировать в отношении предпочтительных биофизических свойств. Один подход заключается в ранжировании семейств и/или генов VH и VL эмбрионального типа в соответствии с распространенностью и последующее тестирование семейств и/или генов VH и VL эмбрионального типа, которые являются наиболее распространенными, например, верхних 20 наиболее распространенных семейств и/или генов VH и VL эмбрионального типа. Кроме того, можно комбинировать верхние 20 наиболее распространенных семейств и/или генов VH и VL эмбрионального типа, что дает, например, 400 комбинаций VH и VL, и тестировать их в отношении предпочтительных биофизических свойств. Кроме того или дополнительно, можно тестировать пары класса VH/VL, которые являются наиболее распространенными, в отношении предпочтительных биофизических свойств.

Предпочтительные биофизические свойства включают, но не ограничиваются этим, то, что: (1) они хорошо экспонируются на фаге в Fab-формате, (2) они хорошо экспонируются на клетках млекопитающих в IgG-формате, (3) они экспрессируются в высоких количествах в Fab-формате, например, in E.coli, и IgG-форматах, например, в клетках млекопитающих, (4) являются термодинамически стабильными; (5) имеют высокую стабильность в сыворотке, (6) имеют низкую тенденцию к агрегации (т.е. высокую растворимость); и (7) имеют низкий риск иммуногенности.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает коллекцию синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,5% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 В-клеток. В некоторых воплощениях пары класса VH и VL присутствуют в концентрации по меньшей мере 1% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 В-клеток. В некоторых воплощениях пары класса VH и VL присутствуют в концентрации по меньшей мере 2%

пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 В-клеток. В некоторых воплощениях В-клетки выделяют из хозяина-человека. В некоторых воплощениях В-клетки являются "наивными". В некоторых аспектах коллекция содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их фрагменты, содержащие каркасные участки VH и VL эмбрионального типа. В некоторых воплощениях коллекция содержит по меньшей мере 1×10^4 последовательностей нуклеиновых кислот, по меньшей мере 1×10^6 последовательностей нуклеиновых кислот; по меньшей мере 1×10^8 последовательностей нуклеиновых кислот, по меньшей мере 1×10^{10} последовательностей нуклеиновых кислот или по меньшей мере 1×10^{11} последовательностей нуклеиновых кислот.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает набор, содержащий данные о последовательностях, иллюстрирующие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их фрагменты, содержащие нуклеиновые кислоты, присутствующие в образце из по меньшей мере 1×10^5 "наивных" В-клеток человека, где указанные данные о последовательностях находятся на считываемом носителе. В некоторых воплощениях изобретение включает коллекцию нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их функциональные фрагменты. В некоторых воплощениях вектор представляет собой фаговый дисплейный вектор. В некоторых воплощениях вектор представляет собой фагмидный вектор. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает клетки-хозяева, трансформированные с помощью векторов коллекции, которые содержат коллекцию нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их функциональные фрагменты. В некоторых воплощениях клетки-хозяева являются прокариотическими. В некоторых воплощениях клетки-хозяева представляют собой E.coli. В некоторых воплощениях клетки-хозяева являются эукариотическими. В некоторых воплощениях клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ получения коллекции синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, включающий: синтез коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,5% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10^5 В-клеток. В некоторых воплощениях В-клетки выделяют из хозяина-человека. В некоторых воплощениях В-клетки являются "наивными". В некоторых воплощениях пары класса VH и VL, находящиеся в образце из по меньшей мере 1×10^5 В-клеток, идентифицируют с помощью способа, включающего:

аа) сбор "наивных" В-клеток от одного или более хозяев-людей;

аб) выделение ДНК из В-клеток, собранных на стадии (аа); и

ав) анализ ДНК, выделенной на стадии (аб).

В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК включает секвенирование ДНК. В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК дополнительно включает определение частоты, с которой каждая пара класса VH и VL находится в образце. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают встраивание нуклеиновых кислот в коллекцию векторов. В некоторых воплощениях вектор представляет собой экспрессирующий вектор. В некоторых воплощениях вектор представляет собой дисплейный вектор. В некоторых воплощениях дисплейный вектор представляет собой фагмидный вектор. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает трансфицирование указанных векторов в подходящую клетку-хозяина. В некоторых

воплощениях клетка-хозяин является прокариотической. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой E.coli. В некоторых воплощениях клетка-хозяин является эукариотической. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающих.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ идентификации антитела или фрагментов антитела, специфических в отношении иммуногена, включающий стадии: а) синтеза коллекции нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их фрагменты, содержащие пары класса VH и VL, присутствующие в концентрации по меньшей мере 0,5% пар класса VH и VL, имеющихся в образце из по меньшей мере 1×10 В-клеток; б) скрининга коллекции против специфического иммуногена; и в) выбора одного или более антител или их фрагментов, специфических в отношении указанного иммуногена. В некоторых воплощениях В-клетки выделены из хозяина-человека. В некоторых воплощениях В-клетки являются "наивными". В некоторых воплощениях пары класса VH и VL, находящиеся в образце из по меньшей мере 1×10^5 В-клеток определены с помощью способа, включающего:

аа) сбор "наивных" В-клеток от одного или более хозяев-людей;

аб) выделение ДНК из В-клеток, собранных на стадии (аа); и

ав) анализ ДНК, выделенной на стадии (аб).

В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК включает секвенирование ДНК. В некоторых воплощениях стадия анализа ДНК дополнительно включает определение частоты, с которой каждая пара класса VH и VL находится в образце. В некоторых воплощениях стадия синтеза коллекции дополнительно включает встраивание указанных нуклеиновых кислот в коллекцию векторов. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает трансфицирование указанных векторов в подходящую клетку-хозяина. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает экспонирование указанную коллекции.

Примеры

Пример 1: Получение сайтов рестрикции на С-конце прокариотической сигнальной ___последовательности и человеческой лидерной последовательности, обеспечивающие полноразмерные участки FR1 эмбрионального типа

В одном аспекте в настоящем описании описаны коллекции антител, содержащие каркасные участки, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа, конкретно FR1. Ожидают, что имеющиеся последовательности эмбрионального типа будут снижать риск иммуногенности антител при введении человеку. Однако следует использовать совместимые сайты рестрикции, позволяющие осуществлять стандартное клонирование нуклеиновых кислот, кодирующих коллекции антител, в дисплейные и/или экспрессирующие векторы, с тем чтобы антитела можно было подвергнуть скринингу против иммуногенов. Раньше сайты рестрикции, используемые для клонирования, часто размещали в пределах каркасных участков, таким образом, модифицируя нуклеиновую кислоту и/или аминокислотную последовательность в направлении от эмбрионального типа. Для обеспечения того, чтобы по меньшей мере каркасный участок 1 (FR1) каждого из антител по настоящему изобретению сохранял белковую последовательность эмбрионального типа, не должно быть неприродных сайтов рестрикции в пределах FR1. Поэтому аспект настоящего изобретения заключается во включении идентичного или по меньшей мере совместимого сайта рестрикции в пределах С-конца прокариотических сигнальных последовательностей и человеческой лидерной последовательности, конкретно в пределах трех С-концевых остатков. Кроме того, сигнальная последовательность и лидерная последовательность, содержащие

идентичный или совместимый сайт рестрикции, должны быть функциональными и позволять хорошие уровни экспонирования и эспрессии антител или их фрагментов как в прокариотических экспрессирующих системах, так и в экспрессирующих системах млекопитающих.

Пример 1.1: Анализ распространенных аминокислотных остатков на С-конце сигнальных последовательностях E.coli

Ниже описан выбор сайтов рестрикции, подлежащих включению в С-конец сигнальной последовательности как ompA, так и phoA E.coli, а также оценка функциональности полученных сигнальных последовательностей.

На первой стадии анализировали общие аминокислотные остатки в трех С-концевых аминокислотах сигнальных последовательностей (с -3 до -1) и получали консенсусную последовательность, как показано в Таблице 1. См. Chou et al., Prediction of protein signal sequences, Protein Pept. Sci. 3(6):615-22 (December 2002).

Таблица 1: Консенсусные последовательности в трех С-концевых аминокислотах сигнальных последовательностей:

-3	-2	-1
A	L	A
S	A	G
V	S	S
T	Q	

В положении -3 наблюдали преимущественно аминокислоты A, S, V и T. В положении -2 наблюдали преимущественно аминокислоты L, A, S и Q. В положении -1 наблюдали преимущественно аминокислоты A, G и S.

Пример 1.2: Выбор сайта рестрикции для сигнальной последовательности (phoA) E.coli тяжелой цепи

После сравнения консенсусных последовательностей, показанных в Таблице 1, с известными сайтами рестрикции, следующие три сайта рестрикции: Aflll, Nhel и Avrll выбрали для встраивания в С-конец phoA и затем исследовали уровни экспрессии. Важно отметить, что изменение нуклеотидных последовательностей дикого типа на модифицированные нуклеотидные последовательности также приводит к изменению аминокислотных последовательностей. Последовательности нуклеиновых кислот выбранных сайтов рестрикции и соответствующие аминокислотные последовательности показаны в Таблице 2.

Таблица 2:			
Aflll	V	L	S
	GTC	TTA	AGY
Nhel	V	L	A
	GTG	CTA	GCN
Avrll	V	L	G
	GTC	CTA	GGN

В качестве контроля исследовали уровни экспрессии сигнальной последовательности phoA дикого типа. Нуклеиновокислотные и аминокислотные последовательности сигнальной последовательности phoA дикого типа, включая 3 С-концевые последовательности, показаны в Таблице 3.

Таблица 3:

Сигнальная последовательность phoA *E. coli* дикого типа (С-концевая аминокислотная последовательность с положения -3 до -1 представляет собой TKA без сайта рестрикции):

M K Q S T I A L A L L P L L F T P V T K A

ATGAAACAGAGCACCATTGCCCTGGCCCTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCCAGTGACCAAAGCC

С-конец PhoA дикого типа	T	K	A
	ACC	AAA	GCC

Для оценки уровней экспрессии сайты рестрикции, показанные в Таблице 2, включали в сигнальную последовательность phoA, таким образом модифицируя аминокислотную последовательность дикого типа. Полученные сигнальные последовательности использовали для экспрессии Fab-фрагментов, содержащих: белковые последовательности эмбрионального типа а) VH3-23 или б) VH1-69. Эти гены эмбрионального типа выбрали, так как известно, что они стабильны и хорошо экспрессируются. В обе последовательности генов эмбрионального типа VH3-23 и VH1-69 встраивали CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) из антитела 4D5 и последовательность гена JH4 эмбрионального типа использовали для FR4. Антитело 4D5 описано в (PDB entry 1FVC; Carter, P., Presta, L, German, C.M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L. et al. (1992); Humanization Biophysical Properties of Human Antibody Domains 551 of an anti-pi 85HER2 antibody for human cancer therapy. Proc. NatI Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289. Создавали плазмиды на основе pMORPHXH (показан на Фиг.50), содержащие: а) сигнальные последовательности phoA, содержащие С-концевые сайты рестрикции и аминокислотные последовательности из Таблицы 2, б) VH последовательности VH3-23 и VH1-69, включающие CDR-H3 и JH4, как описано выше, и в) стабильную и хорошо экспрессирующуюся легкую цепь из MOR03207. Все гены создавали в Geneart (Regensburg, Германия).

Экспрессию и периплазматический транспорт измеряли, выполняя анти-Fd ИФА после периплазматической экстракции. Результаты ИФА экспрессии анти-Fd после периплазматической экстракции с использованием буфера BBS показаны на Фиг.1. Как показано, в группе VH3-23 сигнальные последовательности, включающие С-концевые сайты рестрикции: AflII (VLS), NheI (VLA) и AvrII (VLG), поддерживали уровни экспрессии в диапазоне дикого типа (TKA) с NheI (VLA), более эффективным, чем дикий тип (TKA).

Кроме того, экспрессию Fab в E.coli выполняли после культивирования в течение ночи в колбах при встряхивании и уровни продукции Fab определяли после очистки Fab посредством аффинной хроматографии и замены буфера. Результаты показаны в Таблице 4.

Таблица 4:

Экспрессия Fab с использованием сигнальных последовательностей,включающих С-концевые сайты рестрикции AflII (VLS), NheI (VLA) и AvrII (VLG), по сравнению с диким типом (TKA):

Конструкция Fab	Уровень экспрессии (мг/л)
VH3-23 TKA	11,0
VH3-23 VLS	2,0
VH3-23 VLA	11,0
VH3-23 VLG	9,0
VH 1-69 TKA	7,5
VH 1-69 VLS	5,0

VH 1-69 VLA	2,5
VH 1-69 VLG	3,5

Как показано, сигнальные последовательности, включающие С-концевые сайты рестрикции Aflll (VLS), Nhel (VLA) и Avrll (VLG), по сравнению с диким типом (TKA) экспрессируют сходные количества Fab.

На основании приведенных выше данных, сайт рестрикции Nhel (VLA) выбрали для включения в сигнальные последовательности тяжелой цепи (рпоА). Нуклеиновокислотные и аминокислотные последовательности модифицированной сигнальной последовательности Nhel (VLA) phoA показаны в Таблице 5.

Таблица 5

Модифицированная сигнальная последовательность phoA *E. coli* с С-концевыми сайтами рестрикции VLA и Nhel (= GCTAGC):

M K Q S T I A L A L L P L L F T P V V L A

ATGAAACAGAGCACCATTGCCCTGGCCCTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCCAGTGGT**GCTAGC**C

Пример 1.3: Выбор сайта рестрикции для сигнальной последовательности E.coli (ompA) каппа- и лямбда-легкой цепи:

Способ, аналогичный описанному в Примерах 1.2, использовали для выбора сайтов рестрикции, подлежащих включению в С-концы сигнальных последовательностей (ompA) легких цепей и для каппа, и для лямбда.

После сравнения консенсусных последовательностей, показанных в Таблице 1, с известными сайтами рестрикции, следующие сайты рестрикции:

Ndel (AYG), Ndel (AYA) и BsiWI (TYA) выбрали для включения в С-конец ompA, таким образом модифицируя также аминокислотные последовательности, и затем исследовали уровни экспрессии. Последовательности выбранных сайтов рестрикции показаны в Таблице 6.

Таблица 6:			
Ndel	A	Y	G
	GCA	TAT	GGN
Ndel	A	Y	A
	GCA	TAT	GCN
BsiWI	T	Y	A
	ACG	TAC	GCN

В качестве контроля исследовали уровни экспрессии сигнальной последовательности ompA дикого типа. Нуклеиновокислотные и аминокислотные последовательности сигнальной последовательности ompA дикого типа, включая 3 С-концевые последовательности, показаны в Таблице 7.

Таблица 7:

Сигнальная последовательность ompA *E. coli* дикого типа (С-концевая аминокислотная последовательность от положения -3 до -1 представляет собой AQA без сайта рестрикции):

M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q A

ATGAAAAAAACCGCCATTGCCATTGCCGTGGCCCTGGCAGGCTTTGCCACCGTGGCGCAGGCC

С-конец OmpA дикого типа A Q A

GCG CAG GCC

Для оценки уровней экспрессии сайты рестрикции, показанные в Таблице 6, включали в сигнальные последовательности ompA. Полученные модифицированные сигнальные последовательности использовали для экспрессии Fab-фрагментов, содержащих последовательности генов эмбрионального типа: а) КаппаЧ 012 (IGKV1-39), б) КаррaЗ L6 (IGKV3-11) или в) Лямбда1 V1-13 (IGLV1-40). Эти гены эмбрионального типа выбрали, так как известно, что они стабильны и хорошо экспрессируются. В а) Каппа1 012 (IGKV1-39) и б) Каррa3 L6 (IGKV3-11), включали участок CDR-L3: QQHYTTPPT (для каппа), в в) Лямбда1 V1-13 (IGLV1-40) включали участок CDR-L3: QSYDSSLSGW (для лямбда), и в а)-в), использовали последовательность гена эмбрионального типа Jk1 в качестве FR4 для каппа-легкой цепи; и последовательность гена эмбрионального типа JI2/3 использовали в качестве FR4 для лямбда-легкой цепи. Получали плазмиды pMORPHXH (показаны на Фиг.50), содержащие: а) сигнальные последовательности ompA, содержащие С-концевые сайты рестрикции из Таблицы 6, б) последовательности VL эмбрионального типа Каппа1 012 (IGKV1 -39), б) КаррaЗ L6 (IGKV3-11), или в) Лямбда1 V1-13 (IGLV1-40), включающие CDR-L3 и FR4, как описано выше, и в) конструкцию IGHVH3-23 TKA в качестве тяжелой цепи, описанную в Примере 1.2. Все гены получали в Geneart (Regensburg, Германия).

Экспрессию и периплазматический транспорт измеряли посредством продуцирования Fab в течение ночи в E.coli, периплазматической экстракции и ИФА анти-Fd после периплазматической экстракции. Результаты ИФА экспрессии анти-Fd после периплазматической экстракции с использованием буфера BBS показаны на Фиг.2. Как видно, сигнальная последовательность, включающая NdeI (AYA), демонстрирует такую же или даже лучшую экспрессию, чем дикий тип (AQA).

Кроме того, экспрессию Fab в E.coli определяли после ночного культивирования в колбах при встряхивании и уровни продукции Fab определяли посредством аффинной хроматографии и замены буфера. Результаты показаны в Таблице 8.

Таблица 8:

Экспрессия Fab с использованием сигнальных последовательностей, включающих С-концевые сайты рестрикции NdeI (AYA), по сравнению с диким типом (AQA).

Конструкция	Уровень экспрессии (мг/л)
VK1-39AQA	8,5
VK1 -39 AYA	5,5
VK3-11 AQA	7,0
VK3-11AYA	9,5
VL1-40AQA	5,0
VL1-40AYA	5,0

На основании вышеприведенных данных, сайт рестрикции NdeI (AYA) выбрали для

включения в сигнальные последовательности (ompA) каппа и лямбда. Нуклеиновокислотные и аминокислотные последовательности модифицированной сигнальной последовательности NdeI (AYA) ompaA показаны в Таблице 9.

Таблица 9

Модифицированная сигнальная последовательность ompA E. coli с C-концевым сайтами рестрикции AYA и NdeI (= CATATG):

M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Y A

ATGAAAAAAACCGCCATTGCCATTGCCGTGGCCCTGGCAGGCTTTGCCACCGTGG**CATATG**CC

Пример 1.4: Оценка эффективности экспонирования Fab-фрагментов с помощью сигнальных последовательностей в фаговом дисплее

Как описано в Примерах 1.2 и 1.3, были выбраны следующие сайты рестрикции для включения в С-концы сигнальных последовательностей Fab и лидерные последовательности IgG:

Вариабельные области тяжелой цепи (рпоА и лидер тяжелой цепи): NheI (VLA)

Вариабельные области легкой цепи (к и А) (ompA и каппа лидер): NdeI (AYA)

На Фиг.3 показаны выбранные сайты рестрикции и соответствующие аминокислотные последовательности.

Для того чтобы показать, что эти модифицированные сигнальные последовательности способствуют эффективному транспорту и продукции Fab-фрагментов, создавали векторные конструкции, включающие выбранные сигнальные последовательности в трицистронные дисплейные векторы, которые кодируют VH, VL и pill (фаговый оболочечный белок pill, используемый для фагового дисплея). Это делали для того, чтобы подтвердить, что такие векторы, содержащие выбранные сигнальные последовательности, способны обеспечивать полезные уровни фагового дисплея. Создавали трицистронные векторные конструкции pJPd1 (показаные на Фиг.48), содержащие VH из генов эмбрионального типа VH3-23 или VH1-69, или VL из генов эмбрионального типа VL1-40, VK3-11 или VK1-39, и выбранные сайты рестрикции тяжелой цепи (ompA): NheI (VLA) и ompA дикого типа (TKA) в качестве контроля, или выбранные сайты рестрикции легкой цепи (ompA): NdeI (AYA) и ompA дикого типа (AQA), в качестве контроля. Кроме того, в качестве контролей получали трицистронные векторные конструкции pMORPHSO (показаны на Фиг.51), содержащие то же. Относительные уровни экспонирования показаны в Таблице 10.

Таблица 10:

		Отн.уровень экспонирования	
Вектор	Сигнальная последоват.	VCSM13	Гиперфаг
PMORPH30	VH1-69 TKAVL1-40 AQA	0.6/0.7/0.9	0.7/1.0/1.6
PMORPH30	VH1-69 VLAVL1-40 AYA	0.4/0.2/0.4	0.7/0.4/0.7
pJPd1	VH1-69 TKAVL1-40 AQA	0.6/0.5/0.7	4.8/5.7/5.5
pJPd1	VH1.69 VLA VL1-40 AYA	0.6/0.4/0.7	3.2/2.9/2.9
PMORPH30	VH1-69 TKAVk3-11 AQA	0,8	0,9
PMORPH30	VH1.69 VLAVR3-11 AYA	0,1	0,4
pJPd1	VH1-69 TKAVk3-11 AQA	0,3	1,8
pJPd1	VH1-69 VLAVk3-11 AYA	0,1	1,2
PMORPH30	VH1.69 TKAVkl-39 AQA	н/д	н/д
PMORPH30	VH1.69 VLAVkl-39 AYA	0,3	0,4
pJPd1	VH1-69 TKA Vkl-39 AQA	н/д	н/д
pJPd1	VH1.69 VLA VM-39 AYA	0,2	1,3
PMORPH30	VH3-23 TKA VLI^O AQA	0,6	1,6

PMORPH30	VH3-23 VLA VL1.40 AYA	0,5	1,2
pJPd1	VH3-23 TKA VL1-40 AQA	0,5	7,3
pJPd1	VH3.23 VLA VL1-40 AYA	0,4	4,8
PMORPH30	VH3-23 TKAVkl-39 AQA	н/д	н/д
PMORPH30	VH3-23 VLA VM-39 AYA	0,5	1,6
pJPd1	VH3-23 TKAVkl-39 AQA	н/д	н/д
pJPd1	VH3-23 VLA Vkl-39 AYA	0,6	5,5
PMORPH30	VH3-23 TKAVk3-11 AQA	0,7	2,0
PMORPH30	VH3-23 VLAVk3-11 AYA	1,1	2,8
pJPd1	VH3-23 TKAVk3-11 AQA	0,5	3,9
pJPd1	VH3-23 VLA Vk3-11 AYA	0,4	5,7

н/д - не делали

Как показано, векторы pJPd1, включающие выбранные сигнальные последовательности, давали сравнимые относительные уровни экспонирования, как и векторы pMOPPH30; и превосходные относительные уровни экспонирования по сравнению с векторами pMORPHSO векторы, при использовании гиперфага в качестве вспомогательного фага для фаговой продукции. Поэтому векторы pJPd1, включающие модифицированные сигнальные последовательности, должны хорошо работать для селекции антител или их функциональных фрагментов против целевых антигенов посредством фагового дисплея.

Примеры 1.2-1.4 описывают необходимые инструменты для создания, экспрессии и экспонирования коллекций антител или функциональных фрагментов по настоящему изобретению, поскольку они описывают сигнальные последовательности и лидерные последовательности, содержащие сайты рестрикции, которые обеспечивают участки FR1 с белковыми последовательностями эмбрионального типа, и описывают векторные остовы, полезные для включения описанных коллекций антител или их функциональных фрагментов в систему селекции с помощью фагового дисплея, или экспрессирующие системы млекопитающих для идентификации антител против любого иммуногена. Более того, сигнальные последовательности несут сайты рестрикции, которые обеспечивают полную совместимость с Fab-фаговым дисплеем и экспрессирующими плазмидами и соответствующими IgG экспрессирующими плазмидами.

Пример 1.5: Тестирование лидерных последовательностей тяжелой цепи человека и каппа для экспрессии IgG. содержащих выбранные С-концевые сайты рестрикции

Для того чтобы осуществить легкий переход от Fab, экспрессирующихся в E.coli, к IgG-форматам, экспрессирующимся в системе млекопитающих, создавали человеческие лидерные последовательности для легкой цепи IgG (лидерная последовательность каппа-цепи человека) и тяжелой цепи IgG (лидерная последовательность тяжелой цепи человека), чтобы они содержали те же сайты рестрикции, что и С-концы сигнальных последовательностей ompA (Ndel (AYA)) и phoA (Nhel (VLA)), таким образом модифицируя также некоторые из трех С-концевых аминокислотных последовательностей.

Перенос VH из плазмиды для экспрессии Fab в E.coli в IgG-экспрессирующий вектор млекопитающих можно выполнить с использованием описанного сайта рестрикции Nhel, который находится: (а) на С-конце сигнальной последовательности phoA, а также (б) в соответствующем положении на С-конце лидерной последовательности тяжелой цепи человека. Для того чтобы выполнить это, три концевые аминокислоты сигнальной последовательности phoA модифицировали (из ТКА в VLA), и С-конец лидерной последовательности тяжелой цепи человека адаптировали путем замены аминокислотной последовательности дикого типа (с -3 до -1) с VLS на рпоА-совместимый VLA.

Перенос VL из плазмиды для экспрессии Fab в E.coli в IgG-экспрессирующий вектор

млекопитающих можно выполнить с использованием описанного сайта рестрикции NdeI, который находится (а) на С-конце ompA сигнальной последовательности, а также (б) в соответствующем положении на С-конце лидерной последовательности каппа-цепи человека. Для того чтобы выполнить это, три концевые аминокислоты сигнальной последовательности ompA модифицировали (с AQA в AYA), и С-конец лидерной последовательности каппа-цепи человека адаптировали путем замены аминокислотной последовательности дикого типа (с -3 до -1) с AYG на ompA-совместимый AYA. Лидерные последовательности дикого типа и модифицированные лидерные последовательности тяжелой цепи человека и каппа-цепи человека показаны в Таблице 11.

Таблица 11

Лидерная последовательность тяжелой цепи

А)

Лидерная последовательность дикого типа тяжелой цепи человека (С-концевая аминокислотная последовательность с положения -3 до -1 представляет собой VLS без сайта рестрикции):

А)

M K H L W F F L L L V A A P R W V L S

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC

С-конец лидера тяжелой цепи дикого типа V L S

GTC CTG TCC

Б)

Модифицированная лидерная последовательность тяжелой цепи человека с С-концевыми сайтами рестрикции VLA и NheI (= GCTAGC):

M K H L W F F L L L V A A P R W V L A

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCCGGTGGGT**GCTAGC**C

В)

Лидерная последовательность дикого типа каппа-цепи человека (С-концевая аминокислотная последовательность с положения -3 до -1 представляет собой AYG без сайта рестрикции):

M V L Q T Q V F I S L L L W I S G A Y G

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG

С-конец лидерной последовательности каппа A Y G

GCC TAC GGG

Г)

Модифицированная лидерная последовательность каппа-цепи человека с С-концевыми сайтами рестрикции AYA и NdeI (= CATATG):

M V L Q T Q V F I S L L L W I S G A Y A

ATGGTGCTCCAGACCCAGGTGTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCG**CATATG**CG

Для того чтобы показать, что эти модифицированные сигнальные/лидерные последовательности способствуют эффективному транспорту и продукции человеческого белка 1д01, и модифицированную лидерную последовательность тяжелой цепи человека, и модифицированную лидерную последовательность каппа-цепи человека клонировали в плазмиды pJP_lS (показаны на Фиг.52-54) для экспрессии полноразмерного человеческого IgG1 в системе млекопитающих, заменяя лидерные последовательности дикого типа. Полученные экспрессирующие векторы, содержащие модифицированные

лидерные последовательности, гены вариабельной области, как показано в Таблице 12, и константные области для каппа- или лямбда-легких цепей и тяжелых цепей трансфицировали в клетки HKB11, и человеческий IgG1 очищали из супернатантов клеточных культур через несколько суток после трансфекции с использованием протеин А-хроматографии. Содержание IgG1 определяли после очистки и замены буфера. Выходы экспрессии показаны в Таблице 12.

Таблица 12

VH	VL	Экспрессия IgG1 человека
>hVH169*01	>hVL3-1	36,4 мг/л
>hVH169*01	>hVL3-21	34,5 мг/л
>hVH323	>hVL3-1	40,0 мг/л
>hVH323	>hVL3-21	34,5 мг/л
>hVH330	>hVK320	25,6 мг/л

Все протестированных конструкций экспрессируют высокие количества человеческого IgG1, что указывает на то, что модифицированные лидерные последовательности поддерживают уровни экспрессии. Выбранные модифицированные лидерные последовательности: (а) дают высокие выходы белка IgG в соответствии с используемой векторной системой, (б) обеспечивают полную совместимость для переключения антительных форматов, векторов и экспрессирующих систем между прокариотическими системами и системами млекопитающих, и (в) расположены в сигнальных/лидерных последовательностях, поддерживающих посредством этого полные последовательности FR1 эмбрионального типа.

Пример 2: Идентификация наиболее распространенных пар VH/VL в человеческом репертуаре

Аспект настоящего изобретения представляет собой коллекцию или библиотеку антител или их функциональных фрагментов, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа пар генов эмбрионального типа, наиболее распространенных в иммунном репертуаре человека, где каждое антитело или его функциональные фрагменты содержат белковые последовательности эмбрионального типа соответствующей пары белков эмбрионального типа, где пары белков эмбрионального типа, выбранные для включения в коллекцию, имеют биофизические свойства, которые увеличивают вероятность того, что каждое из антител или их функциональных фрагментов, выбранных из коллекции, могут разрабатываться в клинике и коммерчески успешны. Для того чтобы создать такую коллекцию, нужно было оценить многочисленные критерии.

Как правило, осуществляли следующие стадии: идентифицировали преобладающие пары генов эмбрионального типа из иммунного репертуара человека; синтезировали кДНК преобладающих пар генов эмбрионального типа из иммунного репертуара человека и клонировали в различные векторные окружения и получали антитела или их функциональные фрагменты; антитела или их функциональные фрагменты, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа преобладающих пар генов эмбрионального типа, функционально тестировали для определения их биофизических свойств; и сравнивали биофизические свойства антител или их функциональных фрагментов, содержащих соответствующие пары белков эмбрионального типа; затем выбирали субпопуляцию пар белков эмбрионального типа для включения в коллекцию. В некоторых воплощениях белковые последовательности эмбрионального типа выбранных пар белков эмбрионального типа действуют в качестве каркасов. В таких воплощениях каркасы содержат белковые последовательности

эмбрионального типа выбранных пар белков эмбрионального типа, где оба VH и VL содержат белковые последовательности эмбрионального типа соответствующей пары по меньшей мере в FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3. В конкретных воплощениях CDR3 может быть подвергнут диверсификации. В конкретных воплощениях FR4 является фиксированным, например, для VH можно использовать последовательность JH4, для каппа VL можно использовать, последовательность Jк1 и для лямбда VL можно использовать JI2/3.

Пример 2.1: Определение частоты использования генов эмбрионального типа пар VH/VL

Для того чтобы идентифицировать преобладающие пары генов эмбрионального типа VH/VL из иммунного репертуара человека, анализировали общедоступные данные и брали образцы человеческих B-клеток. В качестве первой стадии рассматривали общедоступные данные для обнаружения статей, в которых описаны пары генов эмбрионального типа VH/VL, выделенных из B-клеток. Как уже упоминалось, многие общедоступные базы данных представляют последовательности антител, однако многие представляют лишь последовательности одного из вариабельных доменов, VH или VL, но редко представляют связь пар генов эмбрионального типа VH/VL. Следующие статьи были определены и проанализированы подробно:

Wardemann H. et al. (2003) Science 301, 1374-1377, и любые вспомогательные таблицы; Yurasov S. et al. (2005) J. Exp.Med. 201, 703-712 и любые вспомогательные таблицы; Tsuiji M. et al. (2006) J. Exp.Med. 203, 393-401, и любые вспомогательные таблицы; Yurasov S. et al. (2006) J. Exp.Med. 203, 2255-2262, и любые вспомогательные таблицы, Tiller T. et al. (2007) Immunity 26, 205-213, и любые вспомогательные таблицы, и Mietzner B. et al. (2008) PNAS 105, 9727-9732, и любые вспомогательные таблицы.

На Фиг.4-9 показаны пары VH/VL из B-клеток, выделенных в Tsuiji M. et al. (2006).

На Фиг.10-12 показаны пары VH/VL из B-клеток, выделенных в Tiller T. et al. (2007).

На Фиг.13-17 показаны пары VH/VL из B-клеток, выделенных в Mietzner B. et al. (2008).

На Фиг.18-20 показаны пары VH/VL из B-клеток, выделенных в Wardemann H. et al. (2003).

На Фиг.21-23 показаны пары VH/VL из B-клеток, выделенных и идентифицированных в Yurasov S. et al. (2005).

На Фиг.24-26 показаны пары VH/VL из B-клеток, выделенных в Yurasov S. et al. (2006).

Дополнительные данные о парах VH/VL идентифицировали из образца человеческих B-клеток, как описано ниже.

Пример 2.2: Определение частоты использования пар генов VH/VL из человеческого образца

Для того чтобы получить дополнительные данные о частоте использования пар генов эмбрионального типа VH/VL, PBMCs (мононуклеарные клетки периферической крови) выделяли из человеческого организма. PBMCs сортировали, кДНК из B-клеток амплифицировали с использованием ПЦР, ДНК из B-клеток секвенировали и затем последовательности анализировали с помощью IgBLAST (NCBI) для идентификации пар генов эмбрионального типа VH/VL из каждой B-клетки.

Пример 2.2(a): Выделение и сортировка человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMCs)

Общие способы выделения и сортировки человеческих PBMCs из венозной крови и мононуклеарных клеток из костного мозга описаны в Tiller et al. JIM 2008. PBMCs выделяли следующим образом. 40 мл венозной крови собирали от донора-человека

(через 7 суток после вакцинации Pandemrix™ (H1N1 вакцина GlaxoSmithKline)) в 4x Li-Heparin пробирки для сбора крови (Sarstedt) (10 мл в каждую). Содержимое каждой системы monovette объединяли в одном 50 мл Falcon (в общем 40 мл) и затем добавляли 100 мкл RosetteSep (StemCell technologies) (2,5 мкл/мл), хорошо перемешивали на шейкере (5 об/мин) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Комбинацию кровь/RosettaSep разбавляли равным объемом 1x PBS (Invitrogen). Добавляли 15 мл FicollPaque (GE Healthcare) в новые 50 мл конические пробирки и 20 мл разведенной крови наслаивали на FicollPaque, в общей сложности (4 пробирки: каждая с 15 мл FicollPaque+20 мл крови). Пробирки центрифугировали на центрифуге в течение 30 мин при 400д (1400 об/мин на лабораторной центрифуге sigma) при комнатной температуре без торможения. После центрифугирования обогащенные PBMCs образовывали слой на границе между плазмой и FicollPaque. PBMCs извлекали из каждой пробирки с помощью пипетки и переносили в новую 50 мл пробирку. PBMCs промывали путем разведения до 40 мл буфером FACS (PBS, 3% FCS) и центрифугировали на центрифуге в течение 10 мин при 1250 об/мин при 4°C.PBMCs подсчитывали с помощью трипанового синего (10 мкл образца+90 мкл трипанового синего (разбавленного PBS 1:10)).

PBMCs окрашивали путем ресуспендирования в примерно 5 мл ледяного буфера FACS. Аликвоты клеток готовили для окрашивания. Флуорофор готовили для тестирования. Аликвоты центрифугировали при 1250 об/мин, 4°C, и супернатант отбрасывали. Антитела для окрашивания добавляли к клеточным осадкам в соответствии со схемой, описанной в Таблице 13.

Таблица 13:

	1	2	3	4	5	6	7
	неокрашенные	APC	FITC	PE	PE-Cy7	ASC	млн B-клеток
объем	1,3 мл	250 мкл	250 мкл	250 мкл	250 мкл	1,3 мл	1,3 мл
число клеток [×10e6)	~2,7	~0,5	~0,5	~0,5	~0,5	~2,7	~2,7
CD19-APC	-	15 мкл	-	-	-	15 мкл	15 мкл
CD27-FITC	-	-	30 мкл	-	-	30 мкл	30 мкл
CD38-PE	-	-	-	15 мкл	-	15 мкл	-
CD20-Биотин					2 мкл	2 мкл	
CD10-PE	-	-	-	-	-	-	15 мкл
lgM-Биотин	-	-	-	-	-		2 мкл
инкубируют 20 мин при 4°C в темноте (здесь 30 мин) промывают 1 мл FACS буфера, 1250 об/мин, 4°C, 5 мин, отбрасывают супернатант							
SA-PE-Cy7 (1:500)					100 мкл (-1: 1500)	200 мкл (-1: 5000)	200 мкл (-1: 5000)
инкубируют 20 мин при 4°C в темноте промывают 1 мл FACS буфера, 1250 об/мин, 4°C, 5 мин, отбрасывают супернатант ресуспендируют осадок окрашенных клеток в 500 мкл FACS буфера							

Затем клетки пропускали через сетчатый фильтр для клеток на FACS пробирках (Eppendorf) во избежание засорения цитометра. Клетки помещали на лед и держали в темноте.

Клетки подвергали одиночной сортировке в соответствии с клеточным поверхностным маркером фенотипа, представляющего интерес.Например, антителосекретирующие клетки представляют собой $CD19^{+}CD20^{low}CD27^{hi}CD38^{hi}$, и зрелые "наивные" B-клетки представляют собой $CD19^{+}CD27^{neg}CD10^{neg}lgM^{+}$. Присутствие клеточных поверхностных маркеров определяли с использованием мышиных антител против человека (AbD: CD19, CD27, CD38, CD-20 и CDIO) (Becton Dickinson: IgM). Клетки сортировали на основании прямого светорассеяния относительно бокового светорассеяния (канал для живых клеток с двойным распознаванием) в 96-луночные планшеты для ПЦР на одной клетке (Eppendorf), содержащие 4 мкл 0,5×PBS, 10 мМ

DTT, 8 ед. RNAsin (Promega) с использованием FACS Aria.

ПЦР планшеты готовили, как показано в Таблице 14.

Таблица 14:

H20, свободная от нуклеазы	3200 мкл
10×PBS	200 мкл
0,1 M DTT	400 мкл
RNAsin (40 ед./мкл, Promega)	200 мкл
	всего 4000 мкл

После сортировки каждый планшет немедленно запечатывали в фольгу (BioRad) и помещали на сухой лед. После окончания сортировки клеток все планшеты замораживали при -80°C.

Пример 2.2(б): ПЦР-амплификация ДНК В-клеток человека

PBMCs выделяли и сортировали, как описано в Примере 2.2(а). Транскрипты Ig гена одиночных отсортированных зрелых "наивных" (mn) В-клеток и антитело-секретирующих клеток (asc) затем амплифицировали с помощью ПЦР для определения спариваний генов эмбрионального типа VH/VL. Общие методы ПЦР-амплификации кДНК В-клеток и полезные для этого праймеры описаны в Tiller et al. J Immunol Methods, 2008.

Общая стратегия ПЦР показана на Фиг.27. Используемые специфические праймеры показаны в Таблице 15.

Таблица 15:

для ПЦР μ- или γ-тяжелой цепи:

HC 1-я ПЦР		
5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG	24
5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	23
5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG	27
5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	24
3' Cμ CH1 (мю)	GGGAATTCTCACAGGAGACGA	21
3' Cg CH1 (гамма)	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	23
HC 2-я ПЦР		
5' AgeI VH1	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG	38
5' AgeI VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG	38
5' AgeI VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	38
5' AgeI VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG	38
5' AgeI VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	38
5' AgeI VH 4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG	40
3' SalI JH 1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG	32
3' SalI JH 3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG	34
3' SalI JH 6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG	33
3' IgG (внутренний)	GTTCGGGGAAGTAGTCCTTGAC	22

для ПЦР каппа-легкой цепи:

к LC 1-я ПЦР		
5' L-Vk 1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG	25
5' L-Vk 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG	28
5' L-Vk 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG	25
3' Ck 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA	24
к LC 2-я ПЦР		
5' Pan Vk	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG	24
3' Ck 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT	22

для ПЦР лямбда-легкой цепи:

(LC 1-я ПЦР		
5' L-Vl 1	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG	23
5' L-Vl 2	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG	23
5' L-Vl 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG	23
5' L-Vl 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	23
5' L-Vl 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG	23
5' L-Vl 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG	23
5' L-Vl 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	23
3' C(	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG	24
(LC 2-я ПЦР		
5'AgeI Vl 1	CTGCTACCGGTTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTGACKCAG	38
5'AgeI Vl 2	CTGCTACCGGTTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTGACTCAG	38
5'AgeI Vl 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG	38
5'AgeI Vl 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA	37
5'AgeI Vl 6	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG	38
5'AgeI Vl 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG	38
3' XhoI Cl	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG	28

кДНК из отдельных отсортированных зрелых "наивных" (mn) В-клеток и антителосекретирующих клеток (asc) синтезировали следующим образом. Сначала готовили RHP-Mix, RT-Mix и RT-Mix на льду. RHP-Mix готовили следующим образом: 115 мкл случайных гексамерных праймеров (Roche) (300 нг/мкл), 115 мкл NP-40 (Sigma) (10%), 35 мкл RNAsin и 542 мкл воды. RT-Mix готовили следующим образом: 660 мкл 5x RT буфера, 110 мкл dNTP (Invitrogen) (25 мМ каждый), 450 мкл воды, 220 мкл 0,1 М DTT

(дитиотреитол), 44 мкл RNAsin (Promega), 55 мкл Superscript III (обратная транскриптаза) (Invitrogen).

Затем планшет помещали на сухой лед и добавляли 3,5 мкл RHP-Mix. Планшет покрывали фольгой и инкубировали при 68°C в водяной бане в течение 1 мин. Затем планшет помещали на обычный лед. После этого добавляли 7 мкл RT-Mix и лунки закрывали алюминиевой фольгой. Программу RT-Амплификации запускали при следующих температурах и в течение следующих периодов времени: 42°C в течение 5', 25°C в течение 10', 50°C в течение 60', 94°C в течение 5' и 4°C и останавливали. кДНК хранили при -20°C.

Гнездовую ПЦР (nested PCR) выполняли следующим образом. Транскрипты человеческих генов IgH, Igk и IgL V амплифицировали с помощью ПЦР независимо. 3,5 мкл кДНК использовали в качестве матрицы. Все ПЦР реакции выполняли в 96-луночных планшетах в общем объеме 40 мкл на лунку. Для каждого планшета готовили 3 реакционные пробирки, каждая с: 1154 мкл воды, 150 мкл 10x буфера, 16 мкл dNTP, 5 мкл 5' смеси праймеров, 5 мкл 3' праймера и 7 мкл HotStar Taq (Qiagen). Все реакции гнездовой ПЦР с геноспецифическими праймерами или смесями праймеров выполняли с 3,5 мкл неочищенного первого ПЦР-продукта. Каждый раунд ПЦР выполняли, как показано в Таблице 16.

Таблица 16:

ПЦР программа для амплификации транскриптов Ig гена человека

Стадия	Температура	Продолжительность
Активация HotStar Taq	94°C	15 мин
Денатурация	94°C	30с
Отжиг	58°C (IgH/lgk) 60°C (lgL)	30с
Элонгация	72°C	55с (1ая ПЦР) 56с (2ая ПЦР) — 50 циклов
Конечая элонгация	72°C	10 мин
Завершение	4°C	∞

Затем 3 мкл аликвоты продуктов вторых ПЦР пропускали на 2%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в буфере 1x TBE с равным количеством загрузочного буфера в течение 45 мин при 150 В. Полосы ДНК визуализировали под УФ светом. Ожидаемые размеры ПЦР-продуктов составляли приблизительно 450 п.н. для Igy, 510 п.н. для 1дк и 405 п.н. для IgA.

4 мкл ПЦР-продуктов VH, Vк и VL (с выравниванием, соответствующим VH или VL продукту) объединяли с 16 мкл ddl-bO (дважды дистиллированная вода) в 96-луночных планшетах и переносили в Eurofins MWG Орегоп, Ebersberg, Германия, для секвенирования планшета. Секвенирующие праймеры были представлены при 10 пмоль/мкл (концентрат 50 пмоль/мкл, разведение 1:5) и показаны в Таблице 17.

Таблица 17:	
μHC:	5' Age VH-Mix
γHC:	3' IgGinternal
VK:	5' Pan-VK
VL:	5' VL-Mix

Результаты секвенирования анализировали с помощью IgBLAST (NCBI) для идентификации генов эмбрионального типа VH, VK и VL, показанных на Фиг.28A-C (28-36).

Пример 2.3 Пары генов эмбрионального типа VH/VL. идентифицированные в иммунном репертуаре человека

Данные о парах генов эмбрионального типа VH/VL, установленные из общедоступной литературы, как описано в Примере 2.1 и показано на Фиг.4-26, объединили с данными, выявленными из человеческого образца, как описано в Примере 2.2 и показано на Фиг.28-36.

Объединенные данные проанализировали и представили в виде ранжирования в Таблице 18, т.е. ранжирования концентрации (%) пар генов эмбрионального типа VH/VL, идентифицированных в иммунном репертуаре человека.

Таблица 18: Частота использования пар генов эмбрионального типа VH/VL в иммунном репертуаре человека

Пол.: представляет положение относительного ранжирования пар VH/VL, как определено по процентному содержанию (%) каждой пары VH/VL из общего образца.

N=2137

Пол.	V тяжелая	V легкая	%
1	IGHV3-23	IGKV1-5	1,26
2	IGHV4-34	IGKV3-20	1,17
3	IGHV3-23	IGKV3-20	1,12
4	IGHV4-39	IGKV3-15	1,03
5	IGHV3-23	IGKV3-15	0,94
6	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
7	IGHV4-39	IGKV1-39/1D-39	0,84
	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,84
8	IGHV4-59	IGKV3-20	0,70
	IGHV1-18	IGKV3-20	0,70
9	IGHV3-30	IGKV3-20	0,66
	IGHV4-39	IGKV1-5	0,66
	IGHV1-69	IGKV1-39/1D-39	0,66
	IGHV5-51	IGLV1-40	0,66
10	IGHV3-23	IGKV4-1	0,61
	IGHV4-39	IGKV3-20	0,61
	IGHV3-23	IGLV2-14	0,61
	IGHV4-39	IGLV 3-21	0,61
11	IGHV3-23	IGKV1-39/1D-39	0,56
	IGHV3-30	IGKV1-39/1D-39	0,56
	IGHV3-30	IGKV3-11	0,56
	IGHV1-69	IGKV3-20	0,56
	IGHV3-48	IGKV3-20	0,56
	IGHV1-2	IGKV3-20	0,56
12	IGHV3-30	IGKV4-1	0,51
	IGHV5-51	IGLV2-14	0,51
13	IGHV4-59	IGKV4-1	0,47
	IGHV5-51	IGKV3-20	0,47
	IGHV3-7	IGKV1-39/1D-39	0,47
	IGHV3-7	IGKV1-5	0,47
	IGHV3-15	IGKV3-20	0,47
	IGHV4-39	IGLV2-14	0,47
	IGHV4-39	IGLV 2-8	0,47
	IGHV4-34	IGLV2-14	0,47
14	IGHV3-23	IGKV3-11	0,42

	IGHV3-30	IGKV1-5	0,42
	IGHV3-30	IGKV3-15	0,42
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,42
	IGHV3-21	IGKV1-5	0,42
	IGHV3-21	IGKV3-15	0,42
	IGHV3-30	IGLV 1-51	0,42
	IGHV4-34	IGLV 1-51	0,42
	IGHV3-21	IGLV 1-51	0,42
	IGHV3-53	IGLV 1-44	0,42
15	IGHV4-59	IGKV3-15	0,37
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,37
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-69	IGKV3-11	0,37
	IGHV3-7	IGKV3-15	0,37
	IGHV1-18	IGKV1-39/1D-39	0,37
	1GHV3-48	IGKV1-39/1D-39	0,37
	IGHV3-33	IGKV3-15	0,37
	IGHV3-53	IGKV1-5	0,37
	IGHV4-59	IGLV 1-40	0,37
	IGHV1-69	IGLV2-14	0,37
	IGHV1-69	IGLV1-44	0,37
	IGHV4-31	IGLV2-14	0,37
	IGHV1-2	IGLV2-14	0,37
16	IGHV3-23	IGKV2-28/2D-28	0,33
	IGHV3-30	IGKV1-9	0,33
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,33
	IGHV5-51	IGKV1-39/1D-39	0,33
	IGHV5-51	IGKV3-15	0,33
	IGHV1-69	IGKV3-15	0,33
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,33
	1GHV3-48	IGKV3-11	0,33
	IGHV3-21	IGKV1-39/1D-39	0,33
	IGHV4-31	IGKV3-20	0,33
	IGHV4-31	IGKV3-11	0,33
	IGHV3-30	IGLV2-14	0,33
	IGHV4-39	IGLV 1-44	0,33
	IGHV1-69	IGLV 1-40	0,33
	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,33
17	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,28

	IGHV4-39	IGKV3-11	0,28
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,28
	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,28
	IGHV5-51	IGKV3-11	0,28
	IGHV5-51	IGKV1-13	0,28
	IGHV3-7	IGKV3-20	0,28
	IGHV3-48	IGKV3-15	0,28
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,28
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,28
	IGHV3-15	IGKV1-39/1D-39	0,28
	IGHV3-15	IGKV1-5	0,28
	IGHV1-2	IGKV1-39/1D-39	0,28
	IGHV3-33	IGKV3-20	0,28
	IGHV3-33	IGKV1-39/1D-39	0,28
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,28
	IGHV3-53	IGKV3-15	0,28
	1GHV3-11	IGKV1-5	0,28

	IGHV4-4	IGKV3-20	0,28
	IGHV1-46	IGKV3-20	0,28
	IGHV3-23	IGLV1-40	0,28
	IGHV3-23	IGLV 3-21	0,28
	IGHV4-39	IGLV1-40	0,28
	IGHV4-34	IGLV1-40	0,28
	IGHV4-34	IGLV 1-47	0,28
	IGHV3-48	IGLV 2-14	0,28
	IGHV3-48	IGLV 1-47	0,28
	IGHV1-2	IGLV1-40	0,28
	IGHV3-9	IGLV 2-14	0,28
	IGHV4-4	IGLV 1-44	0,28
18	IGHV3-23	IGKV1-17	0,23
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,23
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,23
	IGHV1-69	IGKV1-5	0,23
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,23
	IGHV1-18	IGKV1-5	0,23
	1GHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,23
	IGHV3-21	IGKV3-20	0,23
	IGHV3-33	IGKV1-5	0,23
	IGHV3-53	IGKV1-39/1D-39	0,23
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,23
	1GHV3-11	IGKV1-39/1D-39	0,23
	1GHV3-11	IGKV3-15	0,23
	IGHV4-4	IGKV1-39/1D-39	0,23
	IGHV1-46	IGKV1-39/1D-39	0,23
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,23
	IGHV3-23	IGLV1-44	0,23
	IGHV3-23	IGLV2-11	0,23
	IGHV3-23	IGLV3-1	0,23
	1GHV3-30	IGLV1-40	0,23
	IGHV4-39	IGLV1-51	0,23

	IGHV4-39	IGLV 2-23	0,23
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,23
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,23
	1GHV1-69	IGLV 1-51	0,23
	IGHV1-69	IGLV 2-11	0,23
	IGHV1-18	IGLV 2-14	0,23
	IGHV1-18	IGLV 1-40	0,23
	IGHV3-21	IGLV 2-14	0,23
	IGHV1-2	IGLV 1-44	0,23
19	IGHV3-23	IGKV1-27	0,19
	IGHV3-23	IGKV1-8	0,19
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,19
	IGHV4-39	IGKV1-27	0,19
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,19
	IGHV5-51	IGKV1-5	0,19
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-7	IGKV3-11	0,19
	IGHV3-7	IGKV2-30	0,19
	IGHV1-18	IGKV3-15	0,19
	IGHV1-18	IGKV3-11	0,19
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-15	IGKV3-15	0,19
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,19

	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,19
	IGHV4-31	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV4-31	IGKV1-5	0,19
	IGHV4-31	IGKV3-15	0,19
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-53	IGKV3-11	0,19
	IGHV3-74	IGKV3-20	0,19
	IGHV4-4	IGKV1-5	0,19
	IGHV1-46	IGKV1-9	0,19
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,19
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,19
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-23	IGLV2-23	0,19
	IGHV3-30	IGLV1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV2-14	0,19
	IGHV4-59	IGLV1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV1-51	0,19
	IGHV4-34	IGLV2-8	0,19
	IGHV5-51	IGLV1-47	0,19
	1GHV1-69	IGLV2-8	0,19
	IGHV3-7	IGLV1-40	0,19
	IGHV3-15	IGLV1-44	0,19
	IGHV4-31	IGLV2-23	0,19

	IGHV3-33	IGLV2-14	0,19
	IGHV3-33	IGLV1-47	0,19
	IGHV3-33	IGLV2-23	0,19
	IGHV3-33	IGLV3-21	0,19
	IGHV3-9	IGLV1-44	0,19
	IGHV4-4	IGLV2-14	0,19
	IGHV1-46	IGLV1-51	0,19
	IGHV4-61	IGLV1-44	0,19
	IGHV1-8	IGLV2-14	0,19
	IGHV4-28	IGLV2-23	0,19
20	IGHV3-23	IGKV1-9	0,14
	IGHV3-23	IGKV1-16	0,14
	IGHV4-39	IGKV1-6	0,14
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,14
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,14
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,14
	1GHV3-48	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-15	IGKV3-11	0,14
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-15	IGKV1-9	0,14
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-2	IGKV1-5	0,14
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,14
	IGHV3-11	IGKV3-20	0,14
	IGHV3-11	IGKV3-11	0,14

	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,14
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,14
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,14
	IGHV3-74	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-74	IGKV1-5	0,14
	IGHV3-74	IGKV3-15	0,14
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,14
	IGHV4-4	IGKV3-15	0,14
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,14
	IGHV4-4	IGKV3-11	0,14
	IGHV1-46	IGKV1-5	0,14
	IGHV1-46	IGKV3-15	0,14
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,14
	1QHV1-3	IGKV3-15	0,14
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,14
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,14
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,14
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-23	IGLV1-51	0,14
	IGHV3-30	IGLV3-21	0,14
	IGHV3-30	IGLV3-1	0,14
	IGHV4-39	IGLV1-47	0,14
	IGHV4-39	IGLV2-18	0,14
	IGHV4-59	IGLV1-47	0,14
	IGHV5-51	IGLV2-23	0,14
	IGHV5-51	IGLV3-21	0,14
	IGHV1-69	IGLV2-23	0,14
	IGHV3-7	IGLV1-44	0,14
	IGHV3-7	IGLV1-51	0,14
	IGHV3-7	IGLV1-47	0,14
	IGHV3-7	IGLV3-21	0,14
	IGHV1-18	IGLV1-44	0,14
	IGHV1-18	IGLV1-51	0,14
	IGHV3-48	IGLV3-1	0,14
	IGHV3-21	IGLV1-47	0,14
	1GHV3-15	IGLV7-46	0,14
	IGHV4-31	IGLV1-40	0,14
	IGHV4-31	IGLV1-51	0,14
	IGHV4-31	IGLV1-47	0,14
	IGHV1-2	IGLV1-51	0,14
	IGHV1-2	IGLV 2-23	0,14
	IGHV1-2	IGLV 3-1	0,14
	IGHV3-11	IGLV2-14	0,14
	IGHV3-11	IGLV1-44	0,14
	IGHV3-11	IGLV2-11	0,14
	IGHV3-11	IGLV3-1	0,14
	IGHV3-9	IGLV1-47	0,14
	IGHV3-9	IGLV2-11	0,14
	IGHV3-74	IGLV2-23	0,14
	IGHV3-74	IGLV3-21	0,14
	IGHV4-4	IGLV1-40	0,14
	IGHV1-46	IGLV2-14	0,14
	IGHV1-46	IGLV1-44	0,14

	IGHV4-61	IGLV2-14	0,14
21	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV3-30	IGKV2-30	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-6	0,09
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,09
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,09
	IGHV4-39	IGKV2-30	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,09
	IGHV5-51	IGKV2-30	0,09
	IGHV1-69	IGKV1-27	0,09
	1GHV1-69	IGKV1-8	0,09
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-9	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-17	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,09
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,09
	IGHV1-18	IGKV2-30	0,09
	IGHV3-48	IGKV1-9	0,09
	IGHV3-48	IGKV1-17	0,09
	IGHV3-48	IGKV1-16	0,09
	IGHV3-21	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-6	0,09
	IGHV4-31	IGKV4-1	0,09
	IGHV4-31	IGKV1-17	0,09
	IGHV4-31	IGKV1-27	0,09
	IGHV1-2	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV1-2	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-33	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV3-33	IGKV1-9	0,09
	IGHV3-53	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-53	IGKV1-27	0,09
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,09
	IGHV3-11	IGKV1-6	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,09
	IGHV3-74	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-74	IGKV2-30	0,09
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,09
	IGHV1-46	IGKV3-11	0,09
	IGHV1-46	IGKV1-27	0,09

	IGHV1-46	IGKV1-16	0,09
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-8	IGKV3-20	0,09
	IGHV1-8	IGKV4-1	0,09
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,09
	IGHV1-3	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,09
	1GHV3-43	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,09
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,09
	IGHV3-72	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-58	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-66	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-23	1GLV 1-36	0,09
	IGHV3-30	IGLV 2-23	0,09
	IGHV3-30	IGLV2-11	0,09
	IGHV3-30	IGLV9-49	0,09
	IGHV3-30	IGLV3-10	0,09
	IGHV4-39	IGLV3-1	0,09
	IGHV4-39	IGLV6-57	0,09
	IGHV4-59	IGLV2-23	0,09
	IGHV4-59	IGLV3-21	0,09
	IGHV4-59	IGLV2-11	0,09
	IGHV4-34	IGLV1-44	0,09
	IGHV4-34	IGLV2-23	0,09
	IGHV4-34	IGLV3-21	0,09
	IGHV4-34	IGLV3-25	0,09
	IGHV5-51	IGLV1-36	0,09
	IGHV5-51	IGLV3-25	0,09
	IGHV1-69	IGLV1-47	0,09
	IGHV1-69	IGLV3-21	0,09
	IGHV1-69	IGLV3-1	0,09
	IGHV3-7	IGLV2-14	0,09
	IGHV1-18	IGLV2-8	0,09
	IGHV1-18	IGLV6-57	0,09
	IGHV3-48	IGLV2-11	0,09
	IGHV3-21	IGLV1-40	0,09
	IGHV3-21	IGLV1-44	0,09
	IGHV3-21	IGLV3-21	0,09
	IGHV3-21	IGLV2-11	0,09
	IGHV3-21	IGLV4-69	0,09
	IGHV3-15	IGLV1-40	0,09
	IGHV3-15	IGLV1-51	0,09
	IGHV3-15	IGLV3-1	0,09
	IGHV3-15	IGLV2-8	0,09
	IGHV3-15	IGLV7-43	0,09
	IGHV4-31	IGLV3-21	0,09
	IGHV1-2	IGLV2-8	0,09
	IGHV1-2	IGLV7-46	0,09
	IGHV3-33	IGLV6-57	0,09
	IGHV3-53	IGLV2-14	0,09

	IGHV3-11	IGLV 2-23	0,09
	IGHV3-11	IGLV 3-21	0,09
	IGHV3-11	IGLV 4-69	0,09
	IGHV3-9	IGLV 3-21	0,09
	IGHV3-9	IGLV 2-8	0,09
	IGHV3-74	IGLV2-14	0,09
	IGHV4-4	IGLV 1-51	0,09
	IGHV4-4	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-4	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-46	IGLV 2-11	0,09
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,09
	IGHV1-8	IGLV 1-47	0,09
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV2-14	0,09
	IGHV1-3	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV 3-1	0,09
	IGHV3-49	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-51	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-36	0,09
	IGHV3-43	IGLV 1-51	0,09
	IGHV3-64	IGLV 3-21	0,09
	IGHV7-81	IGLV2-14	0,09
	IGHV7-81	IGLV 3-21	0,09
22	IGHV3-23	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-23	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-13	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-30	IGKV5-2	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,05
	IGHV4-39	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-39	IGKV3D-15	0,05
	IGHV4-59	IGKV2-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-59	IGKV1 D-43	0,05
	IGHV4-59	IGKV2D-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,05
	IGHV5-51	IGKV1-9	0,05

	IGHV5-51	IGKV1-17	0,05
	IGHV5-51	IGKV1-27	0,05
	IGHV5-51	IGKV1-12	0,05
	IGHV1-69	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-69	IGKV1-16	0,05
	IGHV1-69	IGKV1-6	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,05

	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,05
	IGHV3-7	IGKV1-6	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-17	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-16	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-12	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV3-48	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-48	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-48	IGKV1-6	0,05
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-15	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-15	IGKV1 D-43	0,05
	IGHV4-31	IGKV1-6	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-29	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-33/1 D-33	0,05
	IGHV1-2	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-6	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-33	IGKV2-24	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-53	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-53	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-53	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,05
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-33/1 D-33	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-17	0,05

	IGHV3-11	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-11	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-9	IGKV1 D-8	0,05
	IGHV4-4	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-4	IGKV1-27	0,05
	IGHV4-4	IGKV1-6	0,05
	IGHV4-4	IGKV1 D-8	0,05
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-46	IGKV1-33/1 D-33	0,05

	IGHV1-46	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-61	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-39/1 D-39	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-33/1 D-33	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,05
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,05
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-24	IGKV1-33/1 D-33	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-33/1 D-33	0,05
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-6	0,05
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,05
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-28	IGKV3-20	0,05
	IGHV4-28	IGKV1-39/1 D-39	0,05
	IGHV3-43	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,05
	IGHV3-43	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-43	IGKV1-33/1 D-33	0,05
	IGHV3-64	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-64	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-64	IGKV2D-29	0,05

	1GHV7-81	IGKV1-5	0,05
	IGHV7-81	IGKV4-1	0,05
	1GHV7-81	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-13	1GKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-13	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-72	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-73	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-73	IGKV1-9	0,05
	IGHV1-58	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-58	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-58	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-20	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV3-23	IGLV1-47	0,05

	IGHV3-23	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-23	IGLV7-43	0,05
	IGHV3-23	IGLV2-18	0,05
	IGHV3-23	IGLV3-19	0,05
	IGHV3-30	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-30	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-30	IGLV6-57	0,05
	IGHV3-30	IGLV3-27	0,05
	IGHV4-39	IGLV7-46	0,05
	IGHV4-39	IGLV3-9	0,05
	IGHV4-59	IGLV2-8	0,05
	IGHV4-59	IGLV6-57	0,05
	IGHV4-59	IGLV3-12	0,05
	IGHV4-34	IGLV2-11	0,05
	IGHV4-34	IGLV1-36	0,05
	IGHV4-34	IGLV7-43	0,05
	IGHV4-34	IGLV9-49	0,05
	IGHV5-51	IGLV7-43	0,05
	IGHV1-69	IGLV6-57	0,05
	IGHV1-69	IGLV3-25	0,05
	IGHV1-69	IGLV3-10	0,05
	IGHV3-7	IGLV2-23	0,05
	IGHV3-7	IGLV3-1	0,05
	IGHV3-7	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-7	IGLV7-46	0,05
	IGHV3-7	IGLV3-27	0,05
	IGHV1-18	IGLV2-23	0,05

	IGHV1-18	IGLV2-11	0,05
	IGHV1-18	IGLV1-36	0,05
	IGHV1-18	IGLV3-25	0,05
	IGHV1-18	IGLV3-10	0,05
	IGHV3-48	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-48	IGLV1-44	0,05
	IGHV3-48	IGLV1-51	0,05
	IGHV3-48	IGLV2-23	0,05
	IGHV3-48	IGLV3-21	0,05
	IGHV3-48	IGLV3-25	0,05
	IGHV3-48	IGLV7-46	0,05
	IGHV3-48	IGLV9-49	0,05
	IGHV3-21	IGLV2-23	0,05
	IGHV3-21	IGLV3-1	0,05
	IGHV3-21	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-21	IGLV6-57	0,05
	IGHV3-21	IGLV3-25	0,05
	IGHV3-21	IGLV7-46	0,05
	IGHV3-15	IGLV2-14	0,05
	IGHV3-15	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-15	IGLV2-23	0,05
	IGHV3-15	IGLV3-21	0,05
	IGHV3-15	IGLV6-57	0,05
	IGHV3-15	IGLV3-25	0,05
	IGHV3-15	IGLV2-18	0,05
	IGHV3-15	IGLV3-22	0,05
	IGHV4-31	IGLV1-44	0,05
	IGHV4-31	IGLV2-11	0,05
	IGHV4-31	IGLV3-1	0,05
	IGHV4-31	IGLV4-69	0,05

	IGHV4-31	IGLV7-43	0,05
	IGHV1-2	IGLV3-21	0,05
	IGHV1-2	IGLV2-11	0,05
	IGHV1-2	IGLV3-27	0,05
	IGHV3-33	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-33	IGLV1-44	0,05
	IGHV3-33	IGLV1-51	0,05
	IGHV3-33	IGLV2-11	0,05
	IGHV3-33	IGLV3-1	0,05
	IGHV3-33	IGLV4-69	0,05
	IGHV3-33	IGLV3-27	0,05
	IGHV3-33	IGLV9-49	0,05
	IGHV3-33	IGLV3-9	0,05
	IGHV3-53	IGLV1-51	0,05
	IGHV3-53	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-53	IGLV2-23	0,05
	IGHV3-53	IGLV2-11	0,05
	IGHV3-53	IGLV3-1	0,05
	IGHV3-53	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-53	IGLV7-46	0,05

	IGHV3-11	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-11	1GLV1-51	0,05
	IGHV3-11	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-11	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-11	IGLV3-25	0,05
	IGHV3-11	IGLV7-46	0,05
	IGHV3-11	IGLV9-49	0,05
	IGHV3-11	IGLV8-61	0,05
	IGHV3-9	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-9	1GLV1-51	0,05
	IGHV3-9	IGLV4-69	0,05
	IGHV3-9	IGLV4-60	0,05
	IGHV3-74	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-74	IGLV2-11	0,05
	IGHV3-74	IGLV3-1	0,05
	IGHV3-74	IGLV2-8	0,05
	IGHV3-74	IGLV7-43	0,05
	IGHV3-74	IGLV7-46	0,05
	IGHV4-4	IGLV2-11	0,05
	IGHV4-4	IGLV3-1	0,05
	IGHV4-4	IGLV3-25	0,05
	IGHV4-4	IGLV9-49	0,05
	IGHV1-46	IGLV1-40	0,05
	IGHV1-46	IGLV1-47	0,05
	IGHV1-46	IGLV2-23	0,05
	IGHV1-46	IGLV3-21	0,05
	IGHV1-46	IGLV6-57	0,05
	IGHV4-61	IGLV2-23	0,05
	IGHV4-61	IGLV3-21	0,05
	IGHV4-61	IGLV3-1	0,05
	IGHV4-61	IGLV7-43	0,05
	IGHV1-8	1GLV1-51	0,05
	IGHV1-8	IGLV2-11	0,05
	IGHV1-8	IGLV2-8	0,05
	IGHV1-8	IGLV9-49	0,05
	IGHV1-24	IGLV2-14	0,05
	IGHV1-24	IGLV1-40	0,05

	IGHV1-24	IGLV1-44	0,05
	IGHV1-24	IGLV3-21	0,05
	IGHV1-24	IGLV2-11	0,05
	IGHV1-3	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV2-14	0,05
	IGHV3-49	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV2-23	0,05
	IGHV3-49	IGLV2-8	0,05
	IGHV4-28	IGLV2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV2-11	0,05
	IGHV3-43	IGLV3-1	0,05
	IGHV3-43	IGLV1-36	0,05

	IGHV3-43	IGLV9-49	0,05
	IGHV3-64	IGLV2-14	0,05
	IGHV3-64	IGLV7-43	0,05
	IGHV7-81	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-72	IGLV1-51	0,05
	IGHV3-72	IGLV4-69	0,05
	IGHV3-73	IGLV1-40	0,05
	IGHV3-73	IGLV1-51	0,05
	IGHV3-73	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-73	IGLV2-11	0,05
	IGHV3-73	IGLV6-57	0,05
	IGHV1-58	IGLV2-14	0,05
	IGHV3-66	IGLV1-44	0,05
	IGHV3-66	IGLV1-47	0,05
	IGHV3-66	IGLV3-25	0,05
	1GHV4-30.2	IGLV3-21	0,05
	IGHV7-4.1	IGLV1-51	0,05
	IGHV3-20	IGLV2-14	0,05

Пример 2.4 Частота использования пар генов эмбрионального типа VH/VL в "наивном" иммунном репертуаре человека

Кроме того, объединенные данные, содержащие данные о парах генов эмбрионального типа VH/VL, установленные из общедоступной литературы, как описано в Примере 2.1 и показано на Фиг.4-26, и данные о парах генов эмбрионального типа VH/VL, выявленные из человеческого образца, как описано в Примере 2.2 и показано на Фиг.28-36, анализировали для того, чтобы определить частоту использования генов эмбрионального типа в репертуаре интактного человека. Важно различать "наивные", "необученные" антигеном, и "обученные" антигеном популяции В-клеток. "Наивные", "необученные" антигеном В-клетки включают, но не ограничиваются этим, незрелые В-клетки, новые эмигрирующие В-клетки и зрелые "наивные" В-клетки, где последовательности антител относятся еще к эмбриональному типу. "Обученные" антигеном В-клетки включают, но не ограничиваются этим, клетки, секретирующие IgG антитело, и В-клетки памяти IgM и IgG, где большинство антител содержат соматические гипермутации.

Считается, что различные пары генов эмбрионального типа сверхпредставлены между двумя популяциями В-клеток: "наивных", "необученных" антигеном В-клеток и по сравнению с "обученными" антигеном популяциями В-клеток. Аспект настоящего изобретения заключается в создании коллекции антител или их функциональных фрагментов, которые могут быть использованы для идентификации антител или их

функциональных фрагментов против любого иммуногена, поэтому может быть предпочтительным получение коллекции, содержащей пары белков эмбрионального типа VH/VL, преимущественно экспрессирующиеся в интактном, "необученном" антигеном иммунном репертуаре.

Для идентификации пар генов эмбрионального типа VH/VL, преимущественно экспрессирующихся в интактном, "необученном" антигеном иммунном репертуаре, объединенные данные из общедоступной литературы, как описано в Примере 2.1 и показано на Фиг.4-26, и данные о парах генов эмбрионального типа VH/VL, выявленные из человеческого образца, как описано в Примере 2.2 и показано на Фиг.28-36, анализировали для разделения популяций "необученных" антигеном В-клеток: незрелых В-клеток, новых эмигрирующих В-клеток и зрелых "наивных" В-клеток от популяций "обученных" антигеном В-клеток. Ранжирование пар генов эмбрионального типа VH/VL, представляющих иммунный репертуар интактного человека, показано в Таблице 19.

Таблица 19

N=1345

Пол.	V тяжелая	V легкая	%
1	IGHV4-34	IGKV3-20	1,56
2	IGHV4-39	IGKV3-15	1,19
3	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,97
4	IGHV3-23	IGKV3-20	0,89
	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
	IGHV1-69	IGKV1-39/1D-39	0,89
5	IGHV4-39	IGKV1-39/1D-39	0,82
	IGHV1-18	IGKV3-20	0,82
	IGHV5-51	IGLV1-40	0,82
6	IGHV4-39	IGKV3-20	0,74
	IGHV4-39	IGKV1-5	0,74
	IGHV4-59	IGKV3-20	0,74
7	IGHV3-23	IGKV1-5	0,67
	IGHV3-23	IGKV3-15	0,67
	IGHV3-30	IGKV1-39/1D-39	0,67
	IGHV3-30	IGKV3-11	0,67
	IGHV1-69	IGKV3-20	0,67
	IGHV4-39	IGLV2-8	0,67
8	IGHV3-23	IGKV1-39/1D-39	0,59
	IGHV3-30	IGKV1-5	0,59
	IGHV3-7	IGKV1-39/1D-39	0,59
	IGHV1-2	IGKV3-20	0,59
	IGHV4-59	IGLV1-40	0,59
	IGHV4-34	IGLV 2-14	0,59
9	IQHV3-23	IGKV4-1	0,52
	IGHV5-51	IGKV3-20	0,52
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,52
	IGHV3-53	IGKV1-5	0,52
	IGHV3-23	IGLV2-14	0,52
	IGHV4-34	IGLV1-51	0,52
	IGHV1-69	IGLV2-14	0,52
	IGHV1-69	IGLV1-40	0,52
10	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,45
	IGHV3-30	IGKV3-20	0,45
	IGHV3-30	IGKV4-1	0,45
	IGHV3-30	IGKV1-9	0,45

	IGHV4-59	IGKV4-1	0,45
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,45
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,45
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,45
	IGHV3-48	IGKV3-20	0,45
	IGHV3-48	IGKV3-11	0,45
	IGHV3-21	IGKV1-39/1D-39	0,45
	IGHV3-21	IGKV3-15	0,45
	IGHV3-15	IGKV3-20	0,45
	IGHV3-15	IGKV1-39/1D-39	0,45
	IGHV3-30	IGLV2-14	0,45
	IGHV5-51	IGLV2-14	0,45
	IGHV3-21	IGLV1-51	0,45
	IGHV1-2	IGLV2-14	0,45
11	IGHV3-23	IGKV2-28/2D-28	0,37
	IGHV3-30	IGKV3-15	0,37
	IGHV4-39	IGKV3-11	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-18	IGKV1-39/1D-39	0,37
	IGHV1-18	IGKV1-5	0,37
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,37
	IGHV3-48	IGKV1-39/1D-39	0,37
	IGHV3-48	IGKV3-15	0,37
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,37
	IGHV3-21	IGKV1-5	0,37

	IGHV3-15	IGKV1-5	0,37
	IGHV4-31	IGKV3-11	0,37
	IGHV3-33	IGKV3-20	0,37
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,37
	IGHV3-23	IGLV1-40	0,37
	IGHV3-30	IGLV1-51	0,37
	IGHV4-39	IGLV2-14	0,37
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,37
	IGHV1-18	IGLV1-40	0,37
	IGHV3-48	IGLV2-14	0,37
	IGHV4-31	IGLV2-14	0,37
12	IGHV3-23	IGKV3-11	0,30
	IGHV3-23	IGKV1-17	0,30
	IGHV3-23	IGKV1-27	0,30
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,30
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,30
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,30
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,30
	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,30
	IGHV5-51	IGKV3-15	0,30
	IGHV5-51	IGKV3-11	0,30
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,30
	IGHV1-69	IGKV1-5	0,30
	IGHV3-7	IGKV3-15	0,30
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-21	IGKV3-20	0,30
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-15	IGKV3-15	0,30
	IGHV3-33	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV3-53	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV3-53	IGKV3-15	0,30
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,30

	IGHV3-11	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV4-4	IGKV3-20	0,30
	IGHV1-46	IGKV3-20	0,30
	IGHV1-46	IGKV1-39/1D-39	0,30
	IGHV3-23	IGLV 3-21	0,30

	IGHV3-23	IGLV3-1	0,30
	IGHV4-39	IGLV1-40	0,30
	IGHV4-39	IGLV1-44	0,30
	IGHV4-39	IGLV1-51	0,30
	1GHV4-59	IGLV1-51	0,30
	IGHV4-34	IGLV1-40	0,30
	IGHV4-34	IGLV1-47	0,30
	IGHV4-34	IGLV 2-8	0,30
	IGHV5-51	IGLV1-44	0,30
	IGHV1-69	IGLV1-51	0,30
	IGHV1-69	IGLV2-8	0,30
	IGHV3-9	IGLV2-14	0,30
	IGHV3-9	IGLV2-23	0,30
	IGHV4-4	IGLV1-44	0,30
	IGHV4-61	IGLV1-44	0,30
13	IGHV3-23	IGKV1-8	0,22
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,22
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,22
	IGHV4-39	IGKV1-27	0,22
	IGHV5-51	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV3-7	IGKV3-20	0,22
	IGHV3-7	IGKV3-11	0,22
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,22
	IGHV1-18	IGKV3-11	0,22
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,22
	1GHV3-15	IGKV3-11	0,22
	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,22
	1GHV4-31	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-31	IGKV3-15	0,22
	1GHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV1-2	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV1-2	IGKV1-5	0,22
	IGHV3-33	IGKV3-15	0,22
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,22
	IGHV3-11	IGKV1-5	0,22
	IGHV3-11	IGKV3-15	0,22

	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-4	IGKV3-15	0,22
	IGHV4-4	IGKV3-11	0,22
	IGHV1-46	IGKV1-9	0,22
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,22
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,22
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,22
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,22
	IGHV3-23	IGLV2-23	0,22
	IGHV3-23	IGLV2-11	0,22
	IGHV4-39	IGLV2-23	0,22

	IGHV1-69	IGLV2-23	0,22
	IGHV1-18	IGLV2-14	0,22
	IGHV3-48	IGLV3-1	0,22
	IGHV3-15	IGLV1-44	0,22
	IGHV4-31	IGLV1-40	0,22
	IGHV1-2	IGLV1-40	0,22
	IGHV1-2	IGLV3-1	0,22
	IGHV3-33	IGLV2-14	0,22
	IGHV3-33	IGLV1-47	0,22
	IGHV3-33	IGLV3-21	0,22
	IGHV3-9	IGLV1-44	0,22
	IGHV3-9	IGLV1-47	0,22
	IGHV3-9	IGLV2-11	0,22
	IGHV1-46	IGLV1-44	0,22
	IGHV1-8	IGLV2-14	0,22
14	IGHV3-23	IGKV1-16	0,15
	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,15
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,15
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,15
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV4-39	IGKV2-30	0,15
	IGHV4-39	IGKV1-6	0,15

	IGHV4-59	IGKV1-5	0,15
	IGHV4-59	IGKV3-15	0,15
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,15
	IGHV5-51	IGKV1-5	0.15
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV1-69	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-69	IGKV3-11	0,15
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-9	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-17	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,15
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,15
	IGHV1-18	IGKV2-30	0,15
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-48	IGKV1-17	0,15
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-15	IGKV1-9	0,15
	IGHV4-31	IGKV3-20	0,15
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV1-2	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,15
	IGHV1-2	IGKV1-27	0,15
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-33	IGKV1-9	0,15
	IGHV3-53	IGKV3-20	0,15

	IGHV3-53	IGKV3-11	0,15
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-11	IGKV3-20	0,15
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-11	IGKV3-11	0,15
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-11	IGKV1-6	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,15
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,15
	IGHV3-74	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-74	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,15
	IGHV4-4	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV4-4	IGKV1-5	0,15
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,15
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,15
	IGHV1-46	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-46	IGKV1-16	0,15
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,15
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,15
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,15
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,15
	IGHV3-30	IGLV1-40	0,15
	IGHV3-30	IGLV1-44	0,15
	IGHV3-30	IGLV2-23	0,15
	IGHV3-30	IGLV3-21	0,15
	IGHV3-30	IGLV9-49	0,15
	IGHV4-39	IGLV2-18	0,15
	IGHV4-59	IGLV2-23	0,15
	IGHV4-59	IGLV2-11	0,15
	IGHV4-34	IGLV1-44	0,15
	IGHV4-34	IGLV2-23	0,15
	IGHV4-34	IGLV3-25	0,15
	IGHV5-51	IGLV1-47	0,15
	IGHV5-51	IGLV2-23	0,15
	IGHV5-51	IGLV3-21	0,15
	IGHV5-51	IGLV1-36	0,15
	IGHV5-51	IGLV3-25	0,15
	IGHV1-69	IGLV1-44	0,15
	IGHV1-69	IGLV2-11	0,15
	IGHV1-69	IGLV3-1	0,15
	IGHV1-18	IGLV1-44	0,15
	IGHV1-18	IGLV2-8	0,15
	IGHV1-18	IGLV6-57	0,15
	IGHV3-48	IGLV1-47	0,15
	IGHV3-21	IGLV2-14	0,15
	IGHV3-21	IGLV1-47	0,15
	IGHV3-21	IGLV2-11	0,15

	IGHV3-15	IGLV7-46	0,15
	IGHV4-31	IGLV1-51	0,15
	IGHV4-31	IGLV1-47	0,15
	IGHV4-31	IGLV2-23	0,15
	IGHV1-2	IGLV1-44	0,15
	IGHV1-2	IGLV1-51	0,15
	IGHV1-2	IGLV2-23	0,15
	IGHV1-2	IGLV2-8	0,15
	IGHV3-11	IGLV3-21	0,15
	IGHV3-11	IGLV3-1	0,15
	IGHV3-9	IGLV3-21	0,15
	IGHV3-74	IGLV3-21	0,15
	IGHV4-4	IGLV2-14	0,15
	IGHV4-4	IGLV1-51	0,15
	IGHV1-46	IGLV1-51	0,15
	IGHV4-61	IGLV2-11	0,15
	IGHV1-24	IGLV2-23	0,15
	IGHV1-3	IGLV2-14	0,15
	IGHV1-3	IGLV3-1	0,15
	IGHV4-28	IGLV1-44	0,15
	IGHV4-28	IGLV1-36	0,15

	IGHV3-43	IGLV1-51	0,15
15	IGHV3-23	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-23	IGKV2-30	0,07
	IGHV3-23	IGKV1-12	0,07
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,07
	IGHV3-30	IGKV2-30	0,07
	IGHV3-30	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-30	IGKV1-16	0,07
	IGHV3-30	IGKV1-6	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,07
	IGHV4-39	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-59	IGKV2-30	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,07
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,07
	IGHV5-51	IGKV1-17	0,07
	IGHV5-51	IGKV1-27	0,07
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-69	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-69	IGKV1-16	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,07
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,07
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,07
	IGHV3-7	IGKV2-30	0,07

	IGHV3-7	IGKV1-27	0,07

	IGHV3-7	IGKV1 D-8	0,07
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,07
	IGHV1-18	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-16	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-12	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,07
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-16	0,07
	IGHV3-48	IGKV1-6	0,07
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,07
	IGHV3-21	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-21	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-15	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-15	IGKV1 D-43	0,07
	IGHV4-31	IGKV1-5	0,07
	IGHV4-31	1GKV4-1	0,07
	IGHV4-31	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-31	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-31	IGKV1-6	0,07
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,07
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-2	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-6	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,07
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,07

	IGHV3-53	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-53	IGKV1-17	0,07
	IGHV3-53	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-53	IGKV1-12	0,07
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,07
	IGHV3-11	IGKV1-33/1D-33	0,07
	1GHV3-11	IGKV1-9	0,07
	IGHV3-11	IGKV1-17	0,07
	1GHV3-11	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV1 D-8	0,07
	IGHV3-74	IGKV3-20	0,07

	IGHV3-74	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-74	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-74	IGKV2-30	0,07
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV4-4	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-4	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-4	IGKV1 D-8	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-5	0,07
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,07
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,07
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-8	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,07

	IGHV1-8	IGKV1-9	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,07
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,07
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,07
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33-	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,07
	IGHV1-3	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-43	IGKV3-11	0,07

Пример 3: Определение частоты использования генов эмбрионального типа VH и VL

Обзор Таблиц 18-19 из Примеров 2.3-4 показывает, что небольшое число генов эмбрионального типа VH, Vк и VA являются доминантным в иммунном репертуаре человека и в иммунном репертуаре интактного человека по сравнению с общим числом генов эмбрионального типа. Wildt с соавт. На с.895-896 также описал это явление. Wildt с соавт. также описал, что часто экспрессирующиеся генные сегменты тяжелой и легкой цепи часто спариваются, и наблюдал, что половина тестируемых спариваний соответствовала только пяти парам генов эмбрионального типа VH/VL.

Кроме того, объединенные данные оценивали для идентификации генов эмбрионального типа VH, Vк и VA, которые независимо высоко экспрессируются в иммунном репертуаре человека. Поэтому данные о парах генов эмбрионального типа VH/VL, идентифицированных из общедоступной литературы, как описано в Примере 2.1 и показано на Фиг.4-26; парах генов эмбрионального типа VH/VL, идентифицированных из человеческого образца, как описано в Примере 2.2 и показано

на Фиг.28-36, и дополнительные литературные ссылки, которые включали экспрессию неспаренных генов эмбрионального типа VH и/или VL (см. Brezinschek H.P. et al. (1997) J. Clin. Invest. 99, 2488, Demaison C et al. (1995) Immunogenetics 42, 342 и Foster S.J. et al. (1997) J. Clin. Invest. 99, 1614, эти статьи включены посредством ссылки во всей своей полноте) объединяли и ранжировали для того, чтобы определить, какие гены эмбрионального типа VH, Vκ и Vλ экспрессировались в иммунном репертуаре человека в наибольшем количестве. В Таблице 20 показано ранжирование по распространенности генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vκ.

Таблица 20: Частота использования неспаренных генов эмбрионального типа VH, Vκ и Vλ в иммунном репертуаре человека

VH n=2463			Vκ n=1656			Vλ n=780		
1	IGHV3-23	10,6	1	IGKV3-20	16,2	1	IGLV2-14	18,1
2	IGHV3-30	8,0	2	IGKV1-39/1D-39	14,2	2	IGLV1-40	11,3
3	IGHV4-39	7,6	3	IGKV1-5	11,2	3	IGLV1-44	11,3
4	IGHV4-34	6,8	4	IGKV3-15	11,1	4	IGLV1-51	10,0
5	IGHV4-59	5,8	5	IGKV4-1	8,5	5	IGLV2-23	8,1
6	IGHV1-69	5,3	6	IGKV3-11	7,6	6	IGLV3-21	8,1
7	IGHV5-51	4,6	7	IGKV2-28/2D-28	6,0	7	IGLV1-47	6,5
8	1GHV3-7	4,5	8	IGKV1-33/1D-33	4,6	8	IGLV3-1	5,3
9	IGHV1-18	4,1	9	IGKV2-30	2,6	9	IGLV2-11	5,1
10	IGHV3-48	4,0	10	IGKV1-9	2,4	10	IGLV2-8	4,5
11	IGHV3-15	3,3	11	IGKV1-17	2,4	11	IGLV6-57	1,7
12	IGHV3-21	3,3	12	IGKV1-27	2,2	12	IGLV3-25	1,5
13	IGHV1-2	3,2	13	IGKV1-8	1,9	13	IGLV7-46	1,5
14	IGHV3-33	3,0	14	IGKV1-16	1,3	14	IGLV1-36	1,2
15	IGHV4-31	3,0	15	IGKV1-6	1,1	15	IGLV7-43	1,2
16	IGHV3-53	2,7	16	IGKV1-12	1,1	16	IGLV9-49	1,2
17	IGHV3-11	2,6	17	IGKV2D-29	1,0	17	IGLV4-69	1,0
18	IGHV3-9	2,2	18	IGKV1-13	0,7	18	IGLV2-18	0,6
19	IGHV4-4	2,1	19	IGKV1D-8	0,5	19	IGLV3-10	0,5
20	IGHV1-46	2,1	20	IGKV2-24	0,5	20	IGLV3-27	0,5
21	IGHV3-74	1,6	21	IGKV5-2	0,4	21	IGLV3-9	0,3
22	IGHV1-24	1,1	22	IGKV1D-12	0,3	22	IGLV3-12	0,1
23	IGHV4-61	1,1	23	IGKV2-40/2D-40	0,3	23	IGLV3-19	0,1
24	IGHV1-8	1,1	24	IGKV3D-20	0,3	24	IGLV3-22	0,1
25	IGHV1-3	1,0	25	IGKV1D-43	0,2	25	IGLV4-60	0,1
26	IGHV3-49	1,0	26	IGKV2D-30	0,2	26	IGLV8-61	0,1
27	IGHV3-43	0,6	27	IGKV3D-11	0,2	27	IGLV3-16	0,0
28	IGHV4-28	0,6	28	IGKV3D-15	0,2	28	IGLV4-3	0,0
29	IGHV3-64	0,5	29	IGKV2-29	0,2	29	IGLV5-37	0,0
30	IGHV7-81	0,5	30	IGKV1D-16	0,1	30	IGLV5-39	0,0
31	IGHV3-13	0,4	31	IGKV1D-17	0,1	31	IGLV5-45	0,0
32	IGHV3-72	0,4	32	IGKV3D-7	0,1	32	IGLV5-52	0,0
33	IGHV1-58	0,3	33	IGKV6-21/6D-21	0,1	33	IGLV10-54	0,0
34	IGHV3-73	0,3	34	IGKV6D-41	0,1			
35	IGHV3-66	0,2	35	IGKV1D-13	0,0			
36	IGHV7-4.1	0,2						
37	IGHV2-5	0,1						
38	IGHV4-30.2	0,1						
39	IGHV3-20	0,1						
40	IGHV6-1	0,0						
41	IGHV-1-e	0,0						
42	IGHV-1-f	0,0						

43	IGHV1-45	0,0
44	IGHV2-26	0,0
45	IGHV2-70	0,0
46	IGHV3-d	0,0
47	IGHV4-b	0,0
48	IGHV4-30.4	0,0
49	IGHV5-a	0,0

При сравнении Таблицы 20, показывающей распространенность несвязанных генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vк, и Таблиц 18-19, показывающих распространенность связанных пар генов эмбрионального типа VH/VL в иммунном репертуаре человека и иммунном репертуаре интактного человека, стало очевидно, что многие из генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vк, которые в значительной степени представлены, при оценке независимо от связи или спаривания, были также в значительной степени представлены при оценке спариваний VH/VL.

Это наблюдение подтверждено графиками, представленными на Фиг.39-40, которые показывают пары генов эмбрионального типа VH/VL иммунного репертуара человека, и Фиг.41-42, которые показывают пары генов эмбрионального типа VH/VL иммунного репертуара интактного человека. На этих графических материалах показано фактическое число каждой пары генов эмбрионального типа VH/VL, идентифицированной из объединенных данных, нанесенных на матрицу, где ось Y представляет ранжирование генов эмбрионального типа VH, и ось X представляет ранжирование генов эмбрионального типа VL.

Пример 4: Селекция спариваний генов эмбрионального типа VH/VL для дальнейшей оценки биофизических свойств

На следующей стадии нужно было определить, какие пары белков эмбрионального типа следует тестировать, поскольку имеется примерно 2500 пар в иммунном репертуаре человека, и цель авторов изобретения заключалась в идентификации того, какие пары белков эмбрионального типа имеют предпочтительные биофизические свойства, которые могли бы помочь при селекции и разработке. Один способ заключается в тестировании пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые встречаются наиболее часто в иммунном репертуаре человека, например, см. Таблицу 18. Можно, например, выбрать верхние четыреста пар для тестирования или выбрать пары генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, экспрессирующиеся выше определенной пороговой концентрации. Этот подход обычно требует синтеза и тестирования большого числа последовательностей пар белков эмбрионального типа вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи; поэтому такой подход не может быть очень эффективным.

В качестве альтернативного подхода, авторы изобретения выбрали субпопуляцию пар эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые представляют, точно воспроизводят или охватывают большую часть преимущественно экспрессирующихся пар из иммунного репертуара человека. Этот подход основан частично на приведенном выше наблюдении, что небольшое число генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи преобладает в иммунном репертуаре человека. Поэтому небольшое число преимущественно экспрессирующихся генов эмбрионального типа (неспаренных) тяжелой и легкой цепи можно комбинировать для создания группы пар, которые являются типичными для иммунного репертуара человека.

Этот подход осуществляют следующим образом. В Примере 3 определяли экспрессию генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области к-легкой цепи и вариабельной области λ-легкой цепи. На следующей стадии выполняли анализ in silico значимых генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vк, где оценивали по меньшей мере следующие факторы: длину CDR, изоэлектрическую точку (p!) (предпочтительная изоэлектрическая точка составляет 7,5 или выше, поскольку она должна обеспечивать стабильность в стандартном буфере для приготовления препаратов при pH от 5,5 до 7), посттрансляционные модификации (PTM) (конкретно, M-связанные сайты гликозилирования (N×S или NxT) или химические модификации, такие как отщепление Asp (часто в DP), изомеризация Asp (DD, DG), дезамидирование (NS, NG), которые могут происходить in vivo (в сыворотке) или при хранении в буфере для приготовления препаратов и приводят к потере связывания антител), присутствие метионинов в CDRs (могут окисляться при воздействии растворителя), присутствие неспаренных цистеинов (будут образовывать дисульфидные связи с любым другим неспаренным цистеином, таким образом приводя к сшиванию белков и/или более низким уровням экспрессии), отклонения от эмбрионального типа, присутствие возможных Т-клеточных эпитопов и теоретическую склонность к агрегации. Выбранные данные из анализа in silico показаны на Фиг.37-38.

На основании анализа in silico наиболее распространенных генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vк, выбрали их субпопуляцию для синтеза, комбинирования и последующего функционального тестирования, эта субпопуляция показана на Фиг.37-38. Как показано, не все наиболее распространенные гены эмбрионального типа VH, Vλ и Vк были выбраны для дальнейшего тестирования. Из наиболее распространенных генов эмбрионального типа VH, как показано в Таблице 20, не были выбраны IGHV4-34, IGHV4-59 и IGHV3-9. Вместо этого, как показано на Фиг.37-38 и в Таблице 21, выбрали IGHV3-74, IGHV3-73 и IGHV6-1. В целом, выбрали 20 генов эмбрионального типа VH. Из наиболее распространенных генов эмбрионального типа Vк, как показано в Таблице 20, не были выбраны IGKV4-1, IGKV2-28/2D-28, IGKV1-33/1D-33 и IGKV1-8. В целом, выбрали 12 генов эмбрионального типа Vк. Из наиболее распространенных генов эмбрионального типа VH, как показано в Таблице 20, не был выбран IGLV1-44. В целом, выбрали 8 генов эмбрионального типа Vλ.

В Таблице 21 снова показано ранжирование частоты использования генов эмбрионального типа VH, Vк и Vλ из иммунного репертуара человека и жирный шрифт и подчеркивание показывает гены эмбрионального типа, которые выбраны для дальнейшего функционального тестирования.

Таблица 21. Ранжирование распространенности генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vκ из общедоступных данных и человеческого образца B-клеток и идентификация генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vκ, которые были выбраны для дальнейшего функционального тестирования и **выделены жирным шрифтом и подчеркнуты**.

VH

n=2463

1	**IGHV3-23**	**10,6**
2	**IGHV3-30**	**8,0**
3	**IGHV4-39**	**7,6**
4	IGHV4-34	6,8
5	IGHV4-59	5,8
6	**IGHV1-69**	**5,3**
7	**IGHV5-51**	**4,6**
8	**IGHV3-7**	**4,5**
9	**IGHV1-18**	**4,1**
10	**IGHV3-48**	**4,0**
11	**IGHV3-15**	**3,3**
12	**IGHV3-21**	**3,3**
13	**IGHV1-2**	**3,2**
14	**IGHV3-33**	**3,0**
15	**IGHV4-31**	**3,0**
16	**IGHV3-53**	**2,7**
17	**IGHV3-11**	**2,6**
18	IGHV3-9	2,2
19	**IGHV4-4**	**2,1**
20	**IGHV1-46**	**2,1**
21	**IGHV3-74**	**1,6**
22	IGHV1-24	1,1
23	IGHV4-61	1,1
24	IGHV1-8	1,1
25	IGHV1-3	1,0
26	IGHV3-49	1,0
27	IGHV3-43	0,6
28	IGHV4-28	0,6
29	IGHV3-64	0,5
30	IGHV7-81	0,5
31	IGHV3-13	0,4
32	IGHV3-72	0,4
33	IGHV1-58	0,3
34	**IGHV3-73**	**0,3**
35	IGHV3-66	0,2
36	IGHV7-4.1	0,2
37	IGHV2-5	0,1
38	IGHV4-30.2	0,1
39	IGHV3-20	0,1
40	**IGHV6-1**	**0,0**
41	IGHV1-e	0,0
42	IGHV1-f	0,0
43	IGHV1-45	0,0
44	IGHV2-26	0,0
45	IGHV2-70	0,0
46	IGHV3-d	0,0
47	IGHV4-b	0,0
48	IGHV4-30.4	0,0
49	IGHV5-a	0,0

Vκ

n=1656

1	**IGKV3-20**	**16,2**
2	**IGKV1-39/1D-39**	**14,2**
3	**IGKV1-5**	**11,2**
4	**IGKV3-15**	**11,1**
5	IGKV4-1	8,5
6	**IGKV3-11**	**7,6**
7	IGKV2-28/2D-28	6,0
8	IGKV1-33/1D-33	4,6
9	**IGKV2-30**	**2,6**
10	**IGKV1-9**	**2,4**
11	**IGKV1-17**	**2,4**
12	**IGKV1-27**	**2,2**
13	IGKV1-8	1,9
14	**IGKV1-16**	**1,3**
15	**IGKV1-6**	**1,1**
16	**IGKV1-12**	**1,1**
17	IGKV2D-29	1,0
18	IGKV1-13	0,7
19	IGKV1D-8	0,5
20	IGKV2-24	0,5
21	IGKV5-2	0,4
22	IGKV1D-12	0,3
23	IGKV2-40/2D-40	0,3
24	IGKV3D-20	0,3
25	IGKV1D-43	0,2
26	IGKV2D-30	0,2
27	IGKV3D-11	0,2
28	IGKV3D-15	0,2
29	IGKV2-29	0,2
30	IGKV1D-16	0,1
31	IGKV1D-17	0,1
32	IGKV3D-7	0,1
33	IGKV6-21/6D-21	0,1
34	IGKV6D-41	0,1
35	IGKV1D-13	0,0

Vλ

n=780

1	**IGLV2-14**	**18,1**
2	**IGLV1-40**	**11,3**
3	IGLV1-44	11,3
4	**IGLV1-51**	**10,0**
5	**IGLV2-23**	**8,1**
6	**IGLV3-21**	**8,1**
7	**IGLV1-47**	**6,5**
8	**IGLV3-1**	**5,3**
9	**IGLV2-11**	**5,1**
10	IGLV2-8	4,5
11	IGLV6-57	1,7
12	IGLV3-25	1,5
13	IGLV7-46	1,5
14	IGLV1-36	1,2
15	IGLV7-43	1,2
16	IGLV9-49	1,2
17	IGLV4-69	1,0
18	IGLV2-18	0,6
19	IGLV3-10	0,5
20	IGLV3-27	0,5
21	IGLV3-9	0,3
22	IGLV3-12	0,1
23	IGLV3-19	0,1
24	IGLV3-22	0,1
25	IGLV4-60	0,1
26	IGLV8-61	0,1
27	IGLV3-16	0,0
28	IGLV4-3	0,0
29	IGLV5-37	0,0
30	IGLV5-39	0,0
31	IGLV5-45	0,0
32	IGLV5-52	0,0
33	IGLV10-54	0,0

Пример 4.1: Рекомбинация часто встречающихся генов эмбрионального типа VH. Vκ и Vλ для получения представления о наиболее распространенных парах VH/VL в иммунном репертуаре человека

Как обсуждалось выше и показано в Таблице 21 и на Фиг.39-40, 41-42, выбраны 20 VH, 12 Vκ и 8 Vλ, когда при комбинировании точно воспроизводят или охватывают большую часть преимущественно экспрессирующихся пар генов эмбрионального типа VH/VL из иммунного репертуара человека и иммунного репертуара интактного человека.

В качестве следующей стадии выбранные 20 VH, 12 Vκ и 8 Vλ генов эмбрионального типа VH, Vκ и Vλ синтезировали и комбинировали для получения 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL, которые точно воспроизводят или охватывают большую часть преимущественно экспрессирующихся пар генов эмбрионального типа VH/VL в иммунном репертуаре человека. Затем 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL тестировали в отношении их биофизических свойств.

В Таблице 22 показаны выбранные гены эмбрионального типа VH, Vκ и Vλ, подлежащие комбинированию для получения 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL.

Таблица 22

VH	Vκ	Vλ
1. IGHV3-23	1. IGKV3-20	1. IGLV2-14
2. IGHV3-30	2. IGKV1-39/1D-39	2. IGLV1-40
3. IGHV4-39	3. IGKV1-5	3. IGLV1-51
4. IGHV1-69	4. IGKV3-15	4. IGLV2-23
5. IGHV5-51	5. IGKV3-11	5. IGLV3-21
6. IGHV3-7	6. IGKV2-30	6. IGLV1-47
7. IGHV1-18	7. IGKV1-9	7. IGLV3-1
8. IGHV3-48	8. IGKV1-17	8. IGLV2-11
9. IGHV3-15	9. IGKV1-27	
10. IGHV3-21	10. IGKV1-16	
11. IGHV1-2	11. IGKV1-6	
12. IGHV3-33	12. IGKV1-12	
13. IGHV4-31		
14. IGHV3-53		
15. IGHV3-11		
16. IGHV4-4		
17. IGHV1-46		
18. IGHV3-74		
19. IGHV3-73		
20. IGHV6-1		

Для того чтобы показать, что 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL, образованных для функционального тестирования, фактически точно воспроизводят или охватывают большую часть преимущественно экспрессирующихся пар генов эмбрионального типа VH/VL в иммунном репертуаре человека, Таблицу 18 воспроизводят ниже в видеТаблицы 23, где 400 пар VH/VL, которые были протестированы, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 23: 400 функционально протестированных пар генов эмбрионального типа VH/VL являются типичными для пар генов эмбрионального типа VH/VL, идентифицированных в иммунном репертуаре человека

Пол.	V тяжелая	V легкая	%
1	IGHV3-23	IGKV1-5	1,26
2	IGHV4-34	IGKV3-20	1,17
3	IGHV3-23	IGKV3-20	1,12
4	IGHV4-39	IGKV3-15	1,03
5	IGHV3-23	IGKV3-15	0,94
6	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89
7	IGHV4-39	IGKV1-39/1D-39	0,84
	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,84
8	IGHV4-59	IGKV3-20	0,70
	IGHV1-18	IGKV3-20	0,70
9	IGHV3-30	IGKV3-20	0,66
	IGHV4-39	IGKV1-5	0,66
	IGHV1-69	IGKV1-39/1D-39	0,66
	IGHV5-51	IGLV 1-40	0,66
10	IGHV3-23	IGKV4-1	0,61
	IGHV4-39	IGKV3-20	0,61
	IGHV3-23	IGLV 2-14	0,61
	IGHV4-39	IGLV 3-21	0,61
11	IGHV3-23	IGKV1-39/1D-39	0,56
	IGHV3-30	IGKV1-39/1D-39	0,56
	IGHV3-30	IGKV3-11	0,56
	IGHV1-69	IGKV3-20	0,56
	IGHV3-48	IGKV3-20	0,56

	IGHV1-2	**IGKV3-20**	**0,56**
12	IGHV3-30	IGKV4-1	0,51
	IGHV5-51	**IGLV 2-14**	**0,51**
13	IGHV4-59	IGKV4-1	0,47
	IGHV5-51	**IGKV3-20**	**0,47**
	IGHV3-7	**IGKV1-39/1D-39**	**0,47**
	IGHV3-7	**IGKV1-5**	**0,47**
	IGHV3-15	**IGKV3-20**	**0,47**
	IGHV4-39	**IGLV 2-14**	**0,47**
	IGHV4-39	IGLV 2-8	0,47
	IGHV4-34	IGLV 2-14	0,47
14	**IGHV3-23**	**IGKV3-11**	**0,42**
	IGHV3-30	**IGKV1-5**	**0,42**
	IGHV3-30	**IGKV3-15**	**0,42**
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,42
	IGHV3-21	**IGKV1-5**	**0,42**
	IGHV3-21	**IGKV3-15**	**0,42**
	IGHV3-30	**IGLV 1-51**	**0,42**
	IGHV4-34	IGLV 1-51	0,42
	IGHV3-21	**IGLV 1-51**	**0,42**
	IGHV3-53	IGLV 1-44	0,42
15	IGHV4-59	IGKV3-15	0,37
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,37
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-69	**IGKV3-11**	**0,37**
	IGHV3-7	**IGKV3-15**	**0,37**
	IGHV1-18	**IGKV1-39/1D-39**	**0,37**
	IGHV3-48	**IGKV1-39/1D-39**	**0,37**
	IGHV3-33	**IGKV3-15**	**0,37**
	IGHV3-53	**IGKV1-5**	**0,37**
	IGHV4-59	IGLV 1-40	0,37
	IGHV1-69	**IGLV 2-14**	**0,37**
	IGHV1-69	IGLV 1-44	0,37
	IGHV4-31	**IGLV 2-14**	**0,37**
	IGHV1-2	**IGLV 2-14**	**0,37**
16	IGHV3-23	IGKV2-28/2D-28	0,33
	IGHV3-30	**IGKV1-9**	**0,33**
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,33
	IGHV5-51	**IGKV1-39/1D-39**	**0,33**
	IGHV5-51	**IGKV3-15**	**0,33**
	IGHV1-69	**IGKV3-15**	**0,33**
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,33
	IGHV3-48	**IGKV3-11**	**0,33**
	IGHV3-21	**IGKV1-39/1D-39**	**0,33**
	IGHV4-31	**IGKV3-20**	**0,33**
	IGHV4-31	**IGKV3-11**	**0,33**
	IGHV3-30	**IGLV 2-14**	**0,33**
	IGHV4-39	IGLV 1-44	0,33
	IGHV1-69	**IGLV 1-40**	**0,33**

	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,33
17	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,28
	IGHV4-39	**IGKV3-11**	**0,28**
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,28
	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,28
	IGHV5-51	**IGKV3-11**	**0,28**
	IGHV5-51	IGKV1-13	0,28
	IGHV3-7	**IGKV3-20**	**0,28**
	IGHV3-48	**IGKV3-15**	**0,28**
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,28
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,28
	IGHV3-15	**IGKV1-39/1D-39**	**0,28**
	IGHV3-15	**IGKV1-5**	**0,28**
	IGHV1-2	**IGKV1-39/1D-39**	**0,28**
	IGHV3-33	**IGKV3-20**	**0,28**
	IGHV3-33	**IGKV1-39/1D-39**	**0,28**
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,28
	IGHV3-53	**IGKV3-15**	**0,28**
	IGHV3-11	**IGKV1-5**	**0,28**
	IGHV4-4	**IGKV3-20**	**0,28**
	IGHV1-46	**IGKV3-20**	**0,28**
	IGHV3-23	**IGLV 1-40**	**0,28**
	IGHV3-23	**IGLV 3-21**	**0,28**
	IGHV4-39	**IGLV 1-40**	**0,28**
	IGHV4-34	IGLV 1-40	0,28
	IGHV4-34	IGLV 1-47	0,28
	IGHV3-48	**IGLV 2-14**	**0,28**
	IGHV3-48	**IGLV 1-47**	**0,28**
	IGHV1-2	**IGLV 1-40**	**0,28**
	IGHV3-9	IGLV 2-14	0,28
	IGHV4-4	IGLV 1-44	0,28
18	**IGHV3-23**	**IGKV1-17**	**0,23**
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,23
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,23
	IGHV1-69	**IGKV1-5**	**0,23**
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,23
	IGHV1-18	**IGKV1-5**	**0,23**
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,23
	IGHV3-21	**IGKV3-20**	**0,23**
	IGHV3-33	**IGKV1-5**	**0,23**
	IGHV3-53	**IGKV1-39/1D-39**	**0,23**
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,23
	IGHV3-11	**IGKV1-39/1D-39**	**0,23**
	IGHV3-11	**IGKV3-15**	**0,23**
	IGHV4-4	**IGKV1-39/1D-39**	**0,23**
	IGHV1-46	**IGKV1-39/1D-39**	**0,23**
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,23
	IGHV3-23	IGLV 1-44	0,23
	IGHV3-23	**IGLV 2-11**	**0,23**
	IGHV3-23	**IGLV 3-1**	**0,23**

	IGHV3-30	**IGLV 1-40**	**0,23**
	IGHV4-39	**IGLV 1-51**	**0,23**
	IGHV4-39	**IGLV 2-23**	**0,23**
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,23
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,23
	IGHV1-69	**IGLV 1-51**	**0,23**
	IGHV1-69	**IGLV 2-11**	**0,23**
	IGHV1-18	**IGLV 2-14**	**0,23**
	IGHV1-18	**IGLV 1-40**	**0,23**
	IGHV3-21	**IGLV 2-14**	**0,23**
	IGHV1-2	IGLV 1-44	0,23
19	**IGHV3-23**	**IGKV1-27**	**0,19**
	IGHV3-23	IGKV1-8	0,19
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,19
	IGHV4-39	**IGKV1-27**	**0,19**
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,19
	IGHV5-51	**IGKV1-5**	**0,19**
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-7	**IGKV3-11**	**0,19**
	IGHV3-7	**IGKV2-30**	**0,19**
	IGHV1-18	**IGKV3-15**	**0,19**
	IGHV1-18	**IGKV3-11**	**0,19**
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-15	**IGKV3-15**	**0,19**
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,19
	IGHV4-31	**IGKV1-39/1D-39**	**0,19**
	IGHV4-31	**IGKV1-5**	**0,19**
	IGHV4-31	**IGKV3-15**	**0,19**
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,19
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,19
	IGHV3-53	**IGKV3-11**	**0,19**
	IGHV3-74	**IGKV3-20**	**0,19**
	IGHV4-4	**IGKV1-5**	**0,19**
	IGHV1-46	**IGKV1-9**	**0,19**
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,19
	IGHV1-24	IGKV3-11	0,19
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,19
	IGHV3-23	**IGLV 2-23**	**0,19**
	IGHV3-30	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV 2-14	0,19
	IGHV4-59	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-59	IGLV 1-51	0,19
	IGHV4-34	IGLV 2-8	0,19
	IGHV5-51	**IGLV 1-47**	**0,19**
	IGHV1-69	IGLV 2-8	0,19
	IGHV3-7	**IGLV 1-40**	**0,19**

	IGHV3-15	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-31	**IGLV 2-23**	**0,19**
	IGHV3-33	**IGLV 2-14**	**0,19**
	IGHV3-33	**IGLV 1-47**	**0,19**
	IGHV3-33	**IGLV 2-23**	**0,19**
	IGHV3-33	**IGLV 3-21**	**0,19**
	IGHV3-9	IGLV 1-44	0,19
	IGHV4-4	**IGLV 2-14**	**0,19**
	IGHV1-46	**IGLV 1-51**	**0,19**
	IGHV4-61	IGLV 1-44	0,19
	IGHV1-8	IGLV 2-14	0,19
	IGHV4-28	IGLV 2-23	0,19
20	**IGHV3-23**	**IGKV1-9**	**0,14**
	IGHV3-23	**IGKV1-16**	**0,14**
	IGHV4-39	**IGKV1-6**	**0,14**
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,14
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,14
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,14
	IGHV3-15	**IGKV3-11**	**0,14**
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-15	**IGKV1-9**	**0,14**
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,14
	IGHV1-2	**IGKV1-5**	**0,14**
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,14
	IGHV3-11	**IGKV3-20**	**0,14**
	IGHV3-11	**IGKV3-11**	**0,14**
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,14
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,14
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,14
	IGHV3-74	**IGKV1-39/1D-39**	**0,14**
	IGHV3-74	**IGKV1-5**	**0,14**
	IGHV3-74	**IGKV3-15**	**0,14**
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,14
	IGHV4-4	**IGKV3-15**	**0,14**
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,14
	IGHV4-4	**IGKV3-11**	0,14
	IGHV1-46	**IGKV1-5**	0,14
	IGHV1-46	**IGKV3-15**	0,14
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,14

	IGHV1-3	IGKV3-15	0,14
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,14
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,14
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,14
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,14
	IGHV3-23	**IGLV 1-51**	0,14
	IGHV3-30	**IGLV 3-21**	0,14
	IGHV3-30	**IGLV 3-1**	0,14
	IGHV4-39	**IGLV 1-47**	0,14
	IGHV4-39	IGLV 2-18	0,14
	IGHV4-59	IGLV 1-47	0,14
	IGHV5-51	**IGLV 2-23**	0,14
	IGHV5-51	**IGLV 3-21**	0,14
	IGHV1-69	**IGLV 2-23**	0,14
	IGHV3-7	IGLV 1-44	0,14
	IGHV3-7	**IGLV 1-51**	0,14
	IGHV3-7	**IGLV 1-47**	0,14
	IGHV3-7	**IGLV 3-21**	0,14
	IGHV1-18	IGLV 1-44	0,14
	IGHV1-18	IGLV 1-51	0,14
	IGHV3-48	**IGLV 3-1**	0,14
	IGHV3-21	**IGLV 1-47**	0,14
	IGHV3-15	IGLV 7-46	0,14
	IGHV4-31	**IGLV 1-40**	0,14
	IGHV4-31	**IGLV 1-51**	0,14
	IGHV4-31	**IGLV 1-47**	0,14
	IGHV1-2	**IGLV 1-51**	0,14
	IGHV1-2	**IGLV 2-23**	0,14
	IGHV1-2	**IGLV 3-1**	0,14
	IGHV3-11	**IGLV 2-14**	0,14
	IGHV3-11	IGLV 1-44	0,14
	IGHV3-11	**IGLV 2-11**	0,14
	IGHV3-11	**IGLV 3-1**	0,14
	IGHV3-9	IGLV 1-47	0,14
	IGHV3-9	IGLV 2-11	0,14
	IGHV3-74	**IGLV 2-23**	0,14
	IGHV3-74	**IGLV 3-21**	0,14
	IGHV4-4	**IGLV 1-40**	0,14
	IGHV1-46	**IGLV 2-14**	0,14
	IGHV1-46	IGLV 1-44	0,14
	IGHV4-61	IGLV 2-14	0,14
21	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,09
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV3-30	**IGKV2-30**	0,09
	IGHV3-30	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-30	**IGKV1-6**	0,09
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,09
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,09

	IGHV4-39	**IGKV2-30**	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,09
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,09
	IGHV5-51	**IGKV2-30**	0,09
	IGHV1-69	**IGKV1-27**	0,09
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,09
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,09
	IGHV3-7	**IGKV1-9**	0,09
	IGHV3-7	**IGKV1-17**	0,09
	IGHV3-7	**IGKV1-27**	0,09
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,09
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,09
	IGHV1-18	**IGKV2-30**	0,09
	IGHV3-48	**IGKV1-9**	0,09
	IGHV3-48	**IGKV1-17**	0,09
	IGHV3-48	**IGKV1-16**	0,09
	IGHV3-21	**IGKV3-11**	0,09
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV3-21	**IGKV1-27**	0,09
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-21	**IGKV1-6**	0,09
	IGHV4-31	IGKV4-1	0,09
	IGHV4-31	**IGKV1-17**	0,09
	IGHV4-31	**IGKV1-27**	0,09
	IGHV1-2	**IGKV3-15**	0,09
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV1-2	**IGKV1-27**	0,09
	IGHV3-33	**IGKV3-11**	0,09
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,09
	IGHV3-33	**IGKV1-9**	0,09
	IGHV3-53	**IGKV3-20**	0,09
	IGHV3-53	**IGKV1-27**	0,09
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,09
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,09
	IGHV3-11	**IGKV1-6**	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,09
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,09
	IGHV3-74	**IGKV3-11**	0,09
	IGHV3-74	**IGKV2-30**	0,09
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,09
	IGHV1-46	**IGKV3-11**	0,09
	IGHV1-46	**IGKV1-27**	0,09
	IGHV1-46	**IGKV1-16**	0,09
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-8	IGKV3-20	0,09

	IGHV1-8	IGKV4-1	0,09
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,09
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,09
	IGHV1-3	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-43	IGKV3-11	0,09
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,09
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,09
	IGHV3-72	IGKV1-5	0,09
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,09
	IGHV1-58	IGKV3-20	0,09
	IGHV3-66	IGKV1-39/1D-39	0,09
	IGHV3-23	IGLV 1-36	0,09
	IGHV3-30	**IGLV 2-23**	0,09
	IGHV3-30	**IGLV 2-11**	0,09
	IGHV3-30	IGLV 9-49	0,09
	IGHV3-30	IGLV 3-10	0,09
	IGHV4-39	**IGLV 3-1**	0,09
	IGHV4-39	IGLV 6-57	0,09
	IGHV4-59	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-59	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-59	IGLV 2-11	0,09
	IGHV4-34	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-34	IGLV 2-23	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-34	IGLV 3-25	0,09
	IGHV5-51	IGLV 1-36	0,09
	IGHV5-51	IGLV 3-25	0,09
	IGHV1-69	**IGLV 1-47**	0,09
	IGHV1-69	**IGLV 3-21**	0,09
	IGHV1-69	**IGLV 3-1**	0,09
	IGHV3-7	**IGLV 2-14**	0,09
	IGHV1-18	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-18	IGLV 6-57	0,09
	IGHV3-48	**IGLV 2-11**	0,09
	IGHV3-21	**IGLV 1-40**	0,09
	IGHV3-21	IGLV 1-44	0,09
	IGHV3-21	**IGLV 3-21**	0,09
	IGHV3-21	**IGLV 2-11**	0,09
	IGHV3-21	IGLV 4-69	0,09
	IGHV3-15	**IGLV 1-40**	0,09
	IGHV3-15	**IGLV 1-51**	0,09
	IGHV3-15	**IGLV 3-1**	0,09
	IGHV3-15	IGLV 2-8	0,09
	IGHV3-15	IGLV 7-43	0,09
	IGHV4-31	**IGLV 3-21**	0,09
	IGHV1-2	IGLV 2-8	0,09

	IGHV1-2	IGLV 7-46	0,09
	IGHV3-33	IGLV 6-57	0,09
	IGHV3-53	**IGLV 2-14**	0,09
	IGHV3-11	**IGLV 2-23**	0,09
	IGHV3-11	**IGLV 3-21**	0,09
	IGHV3-11	IGLV 4-69	0,09
	IGHV3-9	IGLV 3-21	0,09
	IGHV3-9	IGLV 2-8	0,09
	IGHV3-74	**IGLV 2-14**	0,09
	IGHV4-4	**IGLV 1-51**	0,09
	IGHV4-4	**IGLV 2-23**	0,09
	IGHV4-4	IGLV 2-8	0,09
	IGHV1-46	**IGLV 2-11**	0,09
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,09
	IGHV1-8	IGLV 1-47	0,09
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV 2-14	0,09
	IGHV1-3	IGLV 2-23	0,09
	IGHV1-3	IGLV 3-1	0,09
	IGHV3-49	IGLV 3-21	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-44	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-51	0,09
	IGHV4-28	IGLV 1-36	0,09
	IGHV3-43	IGLV 1-51	0,09
	IGHV3-64	IGLV 3-21	0,09
	IGHV7-81	IGLV 2-14	0,09
	IGHV7-81	IGLV 3-21	0,09
22	**IGHV3-23**	**IGKV2-30**	0,05
	IGHV3-23	**IGKV1-12**	0,05
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-23	IGKV1D-13	0,05
	IGHV3-30	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV3-30	**IGKV1-27**	0,05
	IGHV3-30	**IGKV1-16**	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-30	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-30	IGKV5-2	0,05
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,05
	IGHV4-39	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV4-39	IGKV3D-15	0,05
	IGHV4-59	IGKV2-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-43	0,05
	IGHV4-59	IGKV2D-30	0,05
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,05
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,05

	IGHV4-34	IGKV1-12	0,05
	IGHV5-51	**IGKV1-9**	0,05
	IGHV5-51	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV5-51	**IGKV1-27**	0,05
	IGHV5-51	**IGKV1-12**	0,05
	IGHV1-69	**IGKV2-30**	0,05
	IGHV1-69	**IGKV1-16**	0,05
	IGHV1-69	**IGKV1-6**	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,05
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,05
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,05
	IGHV3-7	**IGKV1-6**	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,05
	IGHV1-18	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,05
	IGHV1-18	**IGKV1-16**	0,05
	IGHV1-18	**IGKV1-12**	0,05
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV3-48	**IGKV1-5**	0,05
	IGHV3-48	**IGKV1-27**	0,05
	IGHV3-48	**IGKV1-6**	0,05
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,05
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,05
	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	**IGKV2-30**	0,05
	IGHV3-15	**IGKV1-27**	0,05
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-15	IGKV1-13	0,05
	IGHV3-15	IGKV1D-43	0,05
	IGHV4-31	**IGKV1-6**	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-29	0,05
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-2	**IGKV2-30**	0,05
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,05
	IGHV1-2	**IGKV1-6**	0,05
	IGHV3-33	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,05
	IGHV3-33	**IGKV1-16**	0,05
	IGHV3-33	IGKV2-24	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-53	**IGKV1-9**	0,05
	IGHV3-53	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV3-53	**IGKV1-12**	0,05
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,05
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,05
	IGHV3-11	IGKV1-33/1D-33	0,05

	IGHV3-11	**IGKV1-9**	0,05
	IGHV3-11	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV3-11	**IGKV1-12**	0,05
	IGHV3-11	IGKV1D-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,05
	IGHV3-9	IGKV1-12	0,05
	IGHV3-9	IGKV1D-8	0,05
	IGHV4-4	**IGKV1-17**	0,05
	IGHV4-4	**IGKV1-27**	0,05
	IGHV4-4	**IGKV1-6**	0,05
	IGHV4-4	IGKV1D-8	0,05
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-46	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-46	IGKV1-8	0,05
	IGHV4-61	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,05
	IGHV4-61	IGKV1-13	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,05
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,05
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,05
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,05
	IGHV1-24	IGKV2-40/2D-40	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,05
	IGHV1-3	IGKV1-6	0,05
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,05
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV4-28	IGKV3-20	0,05
	IGHV4-28	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV3-43	IGKV3-15	0,05
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,05
	IGHV3-43	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-43	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-64	IGKV3-15	0,05

	IGHV3-64	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-64	IGKV2D-29	0,05
	IGHV7-81	IGKV1-5	0,05
	IGHV7-81	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-81	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-33/1D-33	0,05
	IGHV3-13	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-13	IGKV2-30	0,05
	IGHV3-72	IGKV3-20	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-9	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-17	0,05
	IGHV3-72	IGKV1-16	0,05
	IGHV3-73	IGKV2-28/2D-28	0,05
	IGHV3-73	**IGKV1-9**	0,05
	IGHV1-58	IGKV1-5	0,05
	IGHV1-58	IGKV4-1	0,05
	IGHV1-58	IGKV3-11	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV4-30.2	IGKV4-1	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV7-4.1	IGKV1-5	0,05
	IGHV3-20	IGKV1-39/1D-39	0,05
	IGHV3-23	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV3-23	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-23	IGLV 7-43	0,05
	IGHV3-23	IGLV 2-18	0,05
	IGHV3-23	IGLV 3-19	0,05
	IGHV3-30	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV3-30	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-30	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-30	IGLV 3-27	0,05
	IGHV4-39	IGLV 7-46	0,05
	IGHV4-39	IGLV 3-9	0,05
	IGHV4-59	IGLV 2-8	0,05
	IGHV4-59	IGLV 6-57	0,05
	IGHV4-59	IGLV 3-12	0,05
	IGHV4-34	IGLV 2-11	0,05
	IGHV4-34	IGLV 1-36	0,05
	IGHV4-34	IGLV 7-43	0,05
	IGHV4-34	IGLV 9-49	0,05
	IGHV5-51	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-69	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-25	0,05
	IGHV1-69	IGLV 3-10	0,05
	IGHV3-7	**IGLV 2-23**	0,05
	IGHV3-7	**IGLV 3-1**	0,05
	IGHV3-7	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-7	IGLV 7-46	0,05

	IGHV3-7	IGLV 3-27	0,05
	IGHV1-18	IGLV 2-23	0,05
	IGHV1-18	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV1-18	IGLV 1-36	0,05
	IGHV1-18	IGLV 3-25	0,05
	IGHV1-18	IGLV 3-10	0,05
	IGHV3-48	**IGLV 1-40**	0,05
	IGHV3-48	IGLV 1-44	0,05
	IGHV3-48	**IGLV 1-51**	0,05
	IGHV3-48	**IGLV 2-23**	0,05
	IGHV3-48	**IGLV 3-21**	0,05
	IGHV3-48	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-48	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-48	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-21	**IGLV 2-23**	0,05
	IGHV3-21	**IGLV 3-1**	0,05
	IGHV3-21	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-21	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-21	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-21	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-15	**IGLV 2-14**	0,05
	IGHV3-15	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV3-15	**IGLV 2-23**	0,05
	IGHV3-15	**IGLV 3-21**	0,05
	IGHV3-15	IGLV 6-57	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-15	IGLV 2-18	0,05
	IGHV3-15	IGLV 3-22	0,05
	IGHV4-31	IGLV 1-44	0,05
	IGHV4-31	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV4-31	**IGLV 3-1**	0,05
	IGHV4-31	IGLV 4-69	0,05
	IGHV4-31	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-2	**IGLV 3-21**	0,05
	IGHV1-2	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV1-2	IGLV 3-27	0,05
	IGHV3-33	**IGLV 1-40**	0,05
	IGHV3-33	IGLV 1-44	0,05
	IGHV3-33	**IGLV 1-51**	0,05
	IGHV3-33	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV3-33	**IGLV 3-1**	0,05
	IGHV3-33	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-27	0,05
	IGHV3-33	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-33	IGLV 3-9	0,05
	IGHV3-53	**IGLV 1-51**	0,05
	IGHV3-53	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV3-53	**IGLV 2-23**	0,05
	IGHV3-53	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV3-53	**IGLV 3-1**	0,05

	IGHV3-53	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-53	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-11	**IGLV 1-40**	0,05
	IGHV3-11	**IGLV 1-51**	0,05
	IGHV3-11	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV3-11	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-11	IGLV 3-25	0,05
	IGHV3-11	IGLV 7-46	0,05
	IGHV3-11	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-11	IGLV 8-61	0,05
	IGHV3-9	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-9	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-9	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-9	IGLV 4-60	0,05
	IGHV3-74	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV3-74	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV3-74	**IGLV 3-1**	0,05
	IGHV3-74	IGLV 2-8	0,05
	IGHV3-74	IGLV 7-43	0,05
	IGHV3-74	IGLV 7-46	0,05
	IGHV4-4	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV4-4	**IGLV 3-1**	0,05
	IGHV4-4	IGLV 3-25	0,05
	IGHV4-4	IGLV 9-49	0,05
	IGHV1-46	**IGLV 1-40**	0,05
	IGHV1-46	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV1-46	**IGLV 2-23**	0,05
	IGHV1-46	**IGLV 3-21**	0,05
	IGHV1-46	IGLV 6-57	0,05
	IGHV4-61	IGLV 2-23	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-21	0,05
	IGHV4-61	IGLV 3-1	0,05
	IGHV4-61	IGLV 7-43	0,05
	IGHV1-8	IGLV 1-51	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-8	IGLV 2-8	0,05
	IGHV1-8	IGLV 9-49	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-14	0,05
	IGHV1-24	IGLV 1-40	0,05
	IGHV1-24	IGLV 1-44	0,05
	IGHV1-24	IGLV 3-21	0,05
	IGHV1-24	IGLV 2-11	0,05
	IGHV1-3	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-49	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-23	0,05
	IGHV3-49	IGLV 2-8	0,05
	IGHV4-28	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-43	IGLV 2-11	0,05

	IGHV3-43	IGLV 3-1	0,05
	IGHV3-43	IGLV 1-36	0,05
	IGHV3-43	IGLV 9-49	0,05
	IGHV3-64	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-64	IGLV 7-43	0,05
	IGHV7-81	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-40	0,05
	IGHV3-13	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-72	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-72	IGLV 4-69	0,05
	IGHV3-73	**IGLV 1-40**	0,05
	IGHV3-73	**IGLV 1-51**	0,05
	IGHV3-73	**IGLV 1-47**	0,05
	IGHV3-73	**IGLV 2-11**	0,05
	IGHV3-73	IGLV 6-57	0,05
	IGHV1-58	IGLV 2-14	0,05
	IGHV3-66	IGLV 1-44	0,05
	IGHV3-66	IGLV 1-47	0,05
	IGHV3-66	IGLV 3-25	0,05
	IGHV4-30.2	IGLV 3-21	0,05
	IGHV7-4.1	IGLV 1-51	0,05
	IGHV3-20	IGLV 2-14	0,05

Пример 4.2

Как обсуждалось в Примере 2.4, важно различать "наивные", "необученные" антигеном и "обученные" антигеном популяции В-клеток. Поэтому Таблица 19, в которой показано ранжирование пар генов эмбрионального типа VH/VL, идентифицированных в иммунном репертуаре интактного человека, воспроизводят в виде Таблицы 24, где 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL, которые синтезировали и комбинировали для дальнейшего функционального тестирования, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 24: 400 функционально протестированных пар генов эмбрионального типа VH/VL являются типичными для пар генов эмбрионального типа VH/VL, идентифицированных в иммунном репертуаре интактного человека

Пол.	V тяжелая	V легкая	%
1	IGHV4-34	IGKV3-20	1,56
2	**IGHV4-39**	**IGKV3-15**	1,19
3	IGHV4-34	IGKV1-39/1D-39	0,97
4	**IGHV3-23**	**IGKV3-20**	0,89
	IGHV4-59	IGKV1-39/1D-39	0,89

	IGHV1-69	**IGKV1-39/1D-39**	0,89
5	**IGHV4-39**	**IGKV1-39/1D-39**	0,82
	IGHV1-18	**IGKV3-20**	0,82
	IGHV5-51	**IGLV 1-40**	0,82
6	**IGHV4-39**	**IGKV3-20**	0,74
	IGHV4-39	**IGKV1-5**	0,74
	IGHV4-59	IGKV3-20	0,74
7	**IGHV3-23**	**IGKV1-5**	0,67
	IGHV3-23	**IGKV3-15**	0,67
	IGHV3-30	**IGKV1-39/1D-39**	0,67
	IGHV3-30	**IGKV3-11**	0,67
	IGHV1-69	**IGKV3-20**	0,67
	IGHV4-39	IGLV 2-8	0,67
8	**IGHV3-23**	**IGKV1-39/1D-39**	0,59
	IGHV3-30	**IGKV1-5**	0,59
	IGHV3-7	**IGKV1-39/1D-39**	0,59
	IGHV1-2	**IGKV3-20**	0,59
	IGHV4-59	IGLV 1-40	0,59
	IGHV4-34	IGLV 2-14	0,59
9	IGHV3-23	IGKV4-1	0,52
	IGHV5-51	**IGKV3-20**	0,52
	IGHV5-51	IGKV4-1	0,52
	IGHV3-53	**IGKV1-5**	0,52
	IGHV3-23	**IGLV 2-14**	0,52
	IGHV4-34	IGLV 1-51	0,52
	IGHV1-69	**IGLV 2-14**	0,52
	IGHV1-69	**IGLV 1-40**	0,52
10	IGHV3-23	IGKV1-33/1D-33	0,45
	IGHV3-30	**IGKV3-20**	0,45
	IGHV3-30	IGKV4-1	0,45
	IGHV3-30	**IGKV1-9**	0,45
	IGHV4-59	IGKV4-1	0,45
	IGHV4-34	IGKV3-15	0,45
	IGHV4-34	IGKV4-1	0,45
	IGHV1-18	IGKV1-33/1D-33	0,45
	IGHV3-48	**IGKV3-20**	0,45
	IGHV3-48	**IGKV3-11**	0,45

	IGHV3-21	**IGKV1-39/1D-39**	0,45
	IGHV3-21	**IGKV3-15**	0,45
	IGHV3-15	**IGKV3-20**	0,45
	IGHV3-15	**IGKV1-39/1D-39**	0,45
	IGHV3-30	**IGLV 2-14**	0,45
	IGHV5-51	**IGLV 2-14**	0,45
	IGHV3-21	**IGLV 1-51**	0,45
	IGHV1-2	**IGLV 2-14**	0,45
11	IGHV3-23	IGKV2-28/2D-28	0,37
	IGHV3-30	**IGKV3-15**	0,37
	IGHV4-39	**IGKV3-11**	0,37
	IGHV1-69	IGKV4-1	0,37
	IGHV1-18	**IGKV1-39/1D-39**	0,37
	IGHV1-18	**IGKV1-5**	0,37
	IGHV1-18	IGKV2-28/2D-28	0,37
	IGHV3-48	**IGKV1-39/1D-39**	0,37
	IGHV3-48	**IGKV3-15**	0,37
	IGHV3-48	IGKV1-33/1D-33	0,37
	IGHV3-21	**IGKV1-5**	0,37
	IGHV3-15	**IGKV1-5**	0,37
	IGHV4-31	**IGKV3-11**	0,37
	IGHV3-33	**IGKV3-20**	0,37
	IGHV3-53	IGKV1-33/1D-33	0,37
	IGHV3-23	**IGLV 1-40**	0,37
	IGHV3-30	**IGLV 1-51**	0,37
	IGHV4-39	**IGLV 2-14**	0,37
	IGHV4-59	IGLV 3-1	0,37
	IGHV1-18	**IGLV 1-40**	0,37
	IGHV3-48	**IGLV 2-14**	0,37
	IGHV4-31	**IGLV 2-14**	0,37
12	**IGHV3-23**	**IGKV3-11**	0,30
	IGHV3-23	**IGKV1-17**	0,30
	IGHV3-23	**IGKV1-27**	0,30
	IGHV4-39	IGKV1-33/1D-33	0,30
	IGHV4-59	IGKV3-11	0,30
	IGHV4-34	IGKV1-5	0,30
	IGHV4-34	IGKV3-11	0,30

	IGHV4-34	IGKV2-28/2D-28	0,30
	IGHV5-51	**IGKV3-15**	0,30
	IGHV5-51	**IGKV3-11**	0,30
	IGHV5-51	IGKV2-28/2D-28	0,30
	IGHV1-69	**IGKV1-5**	0,30
	IGHV3-7	**IGKV3-15**	0,30
	IGHV3-48	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-21	**IGKV3-20**	0,30
	IGHV3-21	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-15	**IGKV3-15**	0,30
	IGHV3-33	**IGKV1-39/1D-39**	0,30
	IGHV3-53	**IGKV1-39/1D-39**	0,30
	IGHV3-53	**IGKV3-15**	0,30
	IGHV3-53	IGKV4-1	0,30
	IGHV3-11	**IGKV1-39/1D-39**	0,30
	IGHV4-4	**IGKV3-20**	0,30
	IGHV1-46	**IGKV3-20**	0,30
	IGHV1-46	**IGKV1-39/1D-39**	0,30
	IGHV3-23	**IGLV 3-21**	0,30
	IGHV3-23	**IGLV 3-1**	0,30
	IGHV4-39	**IGLV 1-40**	0,30
	IGHV4-39	IGLV 1-44	0,30
	IGHV4-39	**IGLV 1-51**	0,30
	IGHV4-59	IGLV 1-51	0,30
	IGHV4-34	IGLV 1-40	0,30
	IGHV4-34	IGLV 1-47	0,30
	IGHV4-34	IGLV 2-8	0,30
	IGHV5-51	IGLV 1-44	0,30
	IGHV1-69	**IGLV 1-51**	0,30
	IGHV1-69	IGLV 2-8	0,30
	IGHV3-9	IGLV 2-14	0,30
	IGHV3-9	IGLV 2-23	0,30
	IGHV4-4	IGLV 1-44	0,30
	IGHV4-61	IGLV 1-44	0,30
13	IGHV3-23	IGKV1-8	0,22
	IGHV3-30	IGKV2-28/2D-28	0,22
	IGHV4-39	IGKV4-1	0,22

	IGHV4-39	**IGKV1-27**	0,22
	IGHV5-51	**IGKV1-39/1D-39**	0,22
	IGHV1-69	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV3-7	**IGKV3-20**	0,22
	IGHV3-7	**IGKV3-11**	0,22
	IGHV3-7	IGKV1-8	0,22
	IGHV1-18	**IGKV3-11**	0,22
	IGHV3-48	IGKV1-8	0,22
	IGHV3-15	**IGKV3-11**	0,22
	IGHV3-15	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV4-31	**IGKV1-39/1D-39**	0,22
	IGHV4-31	**IGKV3-15**	0,22
	IGHV4-31	IGKV1-33/1D-33	0,22
	IGHV1-2	**IGKV1-39/1D-39**	0,22
	IGHV1-2	**IGKV1-5**	0,22
	IGHV3-33	**IGKV3-15**	0,22
	IGHV3-33	IGKV4-1	0,22
	IGHV3-11	**IGKV1-5**	0,22
	IGHV3-11	**IGKV3-15**	0,22
	IGHV3-9	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-4	**IGKV3-15**	0,22
	IGHV4-4	**IGKV3-11**	0,22
	IGHV1-46	**IGKV1-9**	0,22
	IGHV4-61	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV4-61	IGKV4-1	0,22
	IGHV1-3	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-39/1D-39	0,22
	IGHV3-49	IGKV1-17	0,22
	IGHV3-43	IGKV1-5	0,22
	IGHV7-81	IGKV3-20	0,22
	IGHV3-23	**IGLV 2-23**	0,22
	IGHV3-23	**IGLV 2-11**	0,22
	IGHV4-39	**IGLV 2-23**	0,22
	IGHV1-69	**IGLV 2-23**	0,22
	IGHV1-18	**IGLV 2-14**	0,22
	IGHV3-48	**IGLV 3-1**	0,22
	IGHV3-15	IGLV 1-44	0,22

	IGHV4-31	**IGLV 1-40**	0,22
	IGHV1-2	**IGLV 1-40**	0,22
	IGHV1-2	**IGLV 3-1**	0,22
	IGHV3-33	**IGLV 2-14**	0,22
	IGHV3-33	**IGLV 1-47**	0,22
	IGHV3-33	**IGLV 3-21**	0,22
	IGHV3-9	IGLV 1-44	0,22
	IGHV3-9	IGLV 1-47	0,22
	IGHV3-9	IGLV 2-11	0,22
	IGHV1-46	IGLV 1-44	0,22
	IGHV1-8	IGLV 2-14	0,22
14	**IGHV3-23**	**IGKV1-16**	0,15
	IGHV3-23	IGKV2D-29	0,15
	IGHV3-23	IGKV2-40/2D-40	0,15
	IGHV3-30	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV3-30	IGKV1D-8	0,15
	IGHV4-39	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV4-39	**IGKV2-30**	0,15
	IGHV4-39	**IGKV1-6**	0,15
	IGHV4-59	IGKV1-5	0,15
	IGHV4-59	IGKV3-15	0,15
	IGHV4-59	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-17	0,15
	IGHV4-34	IGKV1-16	0,15
	IGHV5-51	**IGKV1-5**	0,15
	IGHV5-51	IGKV1-33/1D-33	0,15
	IGHV1-69	**IGKV3-15**	0,15
	IGHV1-69	**IGKV3-11**	0,15
	IGHV1-69	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-7	**IGKV1-5**	0,15
	IGHV3-7	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-7	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-7	**IGKV1-9**	0,15
	IGHV3-7	**IGKV1-17**	0,15
	IGHV3-7	IGKV1-13	0,15
	IGHV1-18	IGKV4-1	0,15

	IGHV1-18	**IGKV2-30**	0,15
	IGHV3-48	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-48	**IGKV1-17**	0,15
	IGHV3-21	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-21	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-15	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-15	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-15	**IGKV1-9**	0,15
	IGHV4-31	**IGKV3-20**	0,15
	IGHV4-31	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV1-2	**IGKV3-15**	0,15
	IGHV1-2	IGKV4-1	0,15
	IGHV1-2	**IGKV1-27**	0,15
	IGHV3-33	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-33	**IGKV1-9**	0,15
	IGHV3-53	**IGKV3-20**	0,15
	IGHV3-53	**IGKV3-11**	0,15
	IGHV3-53	IGKV1-8	0,15
	IGHV3-11	**IGKV3-20**	0,15
	IGHV3-11	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-11	**IGKV3-11**	0,15
	IGHV3-11	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-11	**IGKV1-6**	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-9	IGKV1-16	0,15
	IGHV3-9	IGKV2D-29	0,15
	IGHV3-74	**IGKV1-39/1D-39**	0,15
	IGHV3-74	**IGKV1-5**	0,15
	IGHV3-74	IGKV4-1	0,15
	IGHV4-4	**IGKV1-39/1D-39**	0,15
	IGHV4-4	**IGKV1-5**	0,15
	IGHV4-4	IGKV4-1	0,15
	IGHV4-4	IGKV2D-29	0,15
	IGHV1-46	**IGKV3-15**	0,15
	IGHV1-46	**IGKV1-16**	0,15
	IGHV4-61	IGKV3-15	0,15
	IGHV1-24	IGKV3-15	0,15

	IGHV1-24	IGKV3-11	0,15
	IGHV1-24	IGKV2-28/2D-28	0,15
	IGHV3-49	IGKV3-20	0,15
	IGHV3-64	IGKV1-5	0,15
	IGHV3-64	IGKV3-11	0,15
	IGHV7-81	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-13	IGKV1-39/1D-39	0,15
	IGHV3-13	IGKV4-1	0,15
	IGHV3-72	IGKV3-15	0,15
	IGHV3-30	**IGLV 1-40**	0,15
	IGHV3-30	IGLV 1-44	0,15
	IGHV3-30	**IGLV 2-23**	0,15
	IGHV3-30	**IGLV 3-21**	0,15
	IGHV3-30	IGLV 9-49	0,15
	IGHV4-39	IGLV 2-18	0,15
	IGHV4-59	IGLV 2-23	0,15
	IGHV4-59	IGLV 2-11	0,15
	IGHV4-34	IGLV 1-44	0,15
	IGHV4-34	IGLV 2-23	0,15
	IGHV4-34	IGLV 3-25	0,15
	IGHV5-51	**IGLV 1-47**	0,15
	IGHV5-51	**IGLV 2-23**	0,15
	IGHV5-51	**IGLV 3-21**	0,15
	IGHV5-51	IGLV 1-36	0,15
	IGHV5-51	IGLV 3-25	0,15
	IGHV1-69	IGLV 1-44	0,15
	IGHV1-69	**IGLV 2-11**	0,15
	IGHV1-69	**IGLV 3-1**	0,15
	IGHV1-18	IGLV 1-44	0,15
	IGHV1-18	IGLV 2-8	0,15
	IGHV1-18	IGLV 6-57	0,15
	IGHV3-48	**IGLV 1-47**	0,15
	IGHV3-21	**IGLV 2-14**	0,15
	IGHV3-21	**IGLV 1-47**	0,15
	IGHV3-21	**IGLV 2-11**	0,15
	IGHV3-15	IGLV 7-46	0,15
	IGHV4-31	**IGLV 1-51**	0,15

	IGHV4-31	**IGLV 1-47**	0,15
	IGHV4-31	**IGLV 2-23**	0,15
	IGHV1-2	IGLV 1-44	0,15
	IGHV1-2	**IGLV 1-51**	0,15
	IGHV1-2	**IGLV 2-23**	0,15
	IGHV1-2	IGLV 2-8	0,15
	IGHV3-11	**IGLV 3-21**	0,15
	IGHV3-11	**IGLV 3-1**	0,15
	IGHV3-9	IGLV 3-21	0,15
	IGHV3-74	**IGLV 3-21**	0,15
	IGHV4-4	**IGLV 2-14**	0,15
	IGHV4-4	**IGLV 1-51**	0,15
	IGHV1-46	**IGLV 1-51**	0,15
	IGHV4-61	IGLV 2-11	0,15
	IGHV1-24	IGLV 2-23	0,15
	IGHV1-3	IGLV 2-14	0,15
	IGHV1-3	IGLV 3-1	0,15
	IGHV4-28	IGLV 1-44	0,15
	IGHV4-28	IGLV 1-36	0,15
	IGHV3-43	IGLV 1-51	0,15
15	**IGHV3-23**	**IGKV1-9**	0,07
	IGHV3-23	**IGKV2-30**	0,07
	IGHV3-23	**IGKV1-12**	0,07
	IGHV3-23	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-23	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-23	IGKV1D-12	0,07
	IGHV3-30	**IGKV2-30**	0,07
	IGHV3-30	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV3-30	**IGKV1-16**	0,07
	IGHV3-30	**IGKV1-6**	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-30	IGKV2-24	0,07
	IGHV3-30	IGKV2D-30	0,07
	IGHV4-39	**IGKV1-17**	0,07
	IGHV4-59	IGKV2-30	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-17	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-27	0,07

	IGHV4-59	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-59	IGKV1-12	0,07
	IGHV4-59	IGKV1D-17	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-9	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-27	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-34	IGKV1-12	0,07
	IGHV5-51	**IGKV1-17**	0,07
	IGHV5-51	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV1-69	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-69	**IGKV2-30**	0,07
	IGHV1-69	**IGKV1-16**	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-29	0,07
	IGHV1-69	IGKV2D-30	0,07
	IGHV1-69	IGKV1D-16	0,07
	IGHV1-69	IGKV3D-15	0,07
	IGHV3-7	**IGKV2-30**	0,07
	IGHV3-7	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV3-7	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-7	IGKV1D-17	0,07
	IGHV1-18	**IGKV3-15**	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-8	0,07
	IGHV1-18	**IGKV1-16**	0,07
	IGHV1-18	**IGKV1-12**	0,07
	IGHV1-18	IGKV1-13	0,07
	IGHV1-18	IGKV2-40/2D-40	0,07
	IGHV3-48	**IGKV1-5**	0,07
	IGHV3-48	**IGKV1-9**	0,07
	IGHV3-48	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV3-48	**IGKV1-16**	0,07
	IGHV3-48	**IGKV1-6**	0,07
	IGHV3-48	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-48	IGKV3D-20	0,07
	IGHV3-48	IGKV1D-12	0,07
	IGHV3-21	**IGKV3-11**	0,07
	IGHV3-21	**IGKV1-27**	0,07

	IGHV3-21	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-15	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV3-15	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-15	IGKV1D-43	0,07
	IGHV4-31	**IGKV1-5**	0,07
	IGHV4-31	IGKV4-1	0,07
	IGHV4-31	**IGKV1-17**	0,07
	IGHV4-31	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV4-31	**IGKV1-6**	0,07
	IGHV4-31	IGKV2-40/2D-40	0,07
	IGHV1-2	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-2	**IGKV2-30**	0,07
	IGHV1-2	IGKV1-8	0,07
	IGHV1-2	**IGKV1-6**	0,07
	IGHV3-33	**IGKV1-5**	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV3-33	IGKV1-8	0,07
	IGHV3-53	IGKV2-28/2D-26	0,07
	IGHV3-53	**IGKV1-9**	0,07
	IGHV3-53	**IGKV1-17**	0,07
	IGHV3-53	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV3-53	**IGKV1-12**	0,07
	IGHV3-53	IGKV2-29	0,07
	IGHV3-53	IGKV1D-16	0,07
	IGHV3-11	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV3-11	**IGKV1-9**	0,07
	IGHV3-11	**IGKV1-17**	0,07
	IGHV3-11	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-9	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-9	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-9	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-27	0,07
	IGHV3-9	IGKV1-8	0,07
	IGHV3-9	IGKV1D-8	0,07
	IGHV3-74	**IGKV3-20**	0,07

	IGHV3-74	**IGKV3-15**	0,07
	IGHV3-74	**IGKV3-11**	0,07
	IGHV3-74	**IGKV2-30**	0,07
	IGHV4-4	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV4-4	**IGKV1-17**	0,07
	IGHV4-4	**IGKV1-27**	0,07
	IGHV4-4	IGKV1D-8	0,07
	IGHV1-46	**IGKV1-5**	0,07
	IGHV1-46	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-46	IGKV1-8	0,07
	IGHV4-61	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-16	0,07
	IGHV4-61	IGKV1-12	0,07
	IGHV1-8	IGKV1-39/1D-39	0,07
	IGHV1-8	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-8	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-8	IGKV3-11	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV1-8	IGKV1-9	0,07
	IGHV1-8	IGKV2-29	0,07
	IGHV1-24	IGKV3-20	0,07
	IGHV1-24	IGKV1-39/1D-39	0,07
	IGHV1-24	IGKV4-1	0,07
	IGHV1-24	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-24	IGKV2-24	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-5	0,07
	IGHV1-3	IGKV3-15	0,07
	IGHV1-3	IGKV1-33/1D-33	0,07
	IGHV1-3	IGKV2-30	0,07
	IGHV1-3	IGKV2D-29	0,07
	IGHV3-49	IGKV1-5	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-15	0,07
	IGHV3-49	IGKV3-11	0,07
	IGHV3-49	IGKV2-28/2D-28	0,07
	IGHV3-43	IGKV4-1	0,07
	IGHV3-43	IGKV3-11	0,07

Пример 5: Получение генов эмбрионального типа для функционального анализа

В качестве следующей стадии гены эмбрионального типа VH, Vλ и Vκ, выбранные для комбинирования и последующего тестирования, как показано в Таблице 25, послали в Geneart (Regensburg, Германия) для оптимизации кодонов, соответствующей экспрессии в E.coli (нейтральной для экспрессии в млекопитающих) и синтеза.

VH	Vκ	Vλ
1.IGHV3-23	1. IGKV3-20	1.1GLV2-14
2. IGHV3-30	2.IGKV1-39/1D-39	2. IGLV1-40
3. IGHV4-39	3.IGKV1-5	3. IGLV1-51
4.1GHV1-69	4. IGKV3-15	4. IGLV2-23
5. IGHV5-51	5. IGKV3-11	5. IGLV3-21
6. IGHV3-7	6. IGKV2-30	6. IGLV1-47
7.IGHV1-18	7.IGKV1-9	7. IGLV3-1
8. IGHV3-48	8.IGKV1-17	8.IGLV2-11
9.IGHV3-15	9.IGKV1-27	
10. IGHV3-21	10.IGKV1-16	
11.IGHV1-2	11.IGKV1-6	
12. IGHV3-33	12.IGKV1-12	
13. IGHV4-31		
14. IGHV3-53		
15.IGHV3-11		
16. IGHV4-4		
17.IGHV1-46		
18. IGHV3-74		
19. IGHV3-73		
20. IGHV6-1		

Последовательности генов эмбрионального типа каждого из генов эмбрионального типа VH, Vλ и Vκ показаны на Фиг.45-47. Каждую последовательность генов эмбрионального типа синтезировали для того, чтобы включить следующее:

а) для VH: лидерная последовательность (модифицированная сигнальная последовательность phoA, включающая сайт рестрикции Nhel, как показано на Фиг.3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 эмбрионального типа (включающие сайт рестрикции BssHII, как показано на Фиг.3); CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) из антитела 4D5, как использовано в Ewert S. et al., J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; и JH4 FR4 (включающий RE сайт Xhol/Sall, как показано на Фиг.3);

б) для Vk: лидерная последовательность (модифицированная сигнальная последовательность ompA, включающая сайт рестрикции Ndel, как показано на Фиг.3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 эмбрионального типа (включающие сайт рестрикции Bbsl, как показано на Фиг.3), каппа-подобный CDR-L3 (QQHYTTPPT) согласно Ewert S. et al,, J. Mol. Biol. (2003) 325, 531-553; и Jk1 FR4 (включающий RE сайт Kpnl, как показано на Фиг.3);

в) для Vλ: лидерная последовательность (модифицированная сигнальная последовательность ompA, включающая сайт рестрикции Ndel, как показано на Фиг.3); FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 эмбрионального типа (включающие сайт рестрикции Bbsl, как показано на Фиг.3), лямбда-подобный CDR-L3 (QSYDSSLSGV5) согласно Ewert S. et al,, J. Moi. Biol. (2003) 325, 531-553; и JI2/3 FR4 (включающий RE сайт Kpnl, как показано на Фиг.3).

Пример 6: Функциональное тестирование пар генов эмбрионального типа VH/VL. типичных для иммунного репертуара человека

Затем 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL тестировали в отношении следующих свойств: а) относительный уровень экспонирования после продукции фага и фагового ИФА в Fab-формате; б) относительные уровни экспрессии Fab после

продукции Fab в E.coli, лизис клеток E.coli и ИФА-детекция продуцируемого Fab; в) термостабильность Fab после продукции Fab в E.coli, лизис клеток £. co//' и ИФА-детекция неденатурированного Fab после инкубации при повышенных температурах; г) стабильность Fab из лизатов E.coli в сыворотке крупного рогатого скота/мышей посредством ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей; д) относительные уровни экспрессии человеческого IgG1 после продукции IgG1 в клетках млекопитающих и ИФА-детекции секретируемого IgG1 из супернатантов клеточных культур; и е) стабильность человеческого IgG1 в сыворотке крупного рогатого скота, как определено посредством ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей.

Пример 6.1: Создание пула Fab. экспонируемого на фаге. для функциональной характеристики

Антитело или фрагменты антитела, синтезированные в Примере 5, показанные в Таблице 25, клонировали в трицистронный Fab дисплейный вектор pJPcH (Фиг.48) для функционального тестирования. Создавали пулы Fab, которые содержали комбинации каждого из основных генов, 20 VH, комбинированных с 8 Vλ и 12 Vκ, которые давали 400 комбинаций, которые представляли подавляющее большинство из наиболее распространенных пар генов эмбрионального типа VH/VL из иммунного репертуара человека, как

показано в Таблице 18 и на Фиг.39-40.

Фаг, содержащий вышеуказанные пары генов, продуцировали в небольшом масштабе, используя 96-луночные планшеты. Эталонный планшет готовили, наполняя каждую из лунок 2х средой YT/CAM/TET/Gluc и внося клоны из 400 комбинаций VH/VL, где pMORPH30_Vk3-11_AQA / VH3-23_TKA или pMORPH30_Vk3-11_AYA / VH3-23_VLA (pMORPH30 показана на Фиг.51) использовали в качестве контроля. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C при встряхивании. Эталонные планшеты хранили при конечной концентрации глицерина 15% и замораживали при -80°C.

Дополнительные 96-луночные планшеты готовили для продукции фагов, используя 2×YT/CAM/TET/Gluc в качестве среды и внося клоны из эталонных планшетов, описанных выше. Планшеты инкубировали при 37°C в течение примерно 2-4 ч при встряхивании при 400 об/мин до достижения ООбООнм

примерно 0,5.

Планшеты инфицировали 5 мкл вспомогательного фага на лунку (НурегрПаде; PROGEN; 1×10^{12} БОЕ/мл (бляшкообразующая единица). Планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 мин без встряхивания и затем в течение 60 мин при встряхивании при 400 об/мин. Бактерии собирали центрифугированием при 2200д в течение 5 мин при 4°C.

Супернатанты, содержащие вспомогательный фаг, отбрасывали и инфицированные осадки E.coli ресуспендировали с помощью 2xYT/Cam/TET/Kan/IPTG без глюкозы. Ресуспендированные осадки переносили в новый 96-луночный планшет с глубокими лунками, предварительно заполненный 2×YT/Cm/TET/Kan/IPTG. Планшеты инкубировали в течение ночи при 22°C, при встряхивании. Фаг-содержащие супернатанты собирали центрифугированием и отбрасывали клетки E.coli и дебрис.

Пример 6.2: Оценка ранжирования фагового дисплея Fab с использованием ИФА

Фаговые супернатанты, приготовленные, как описано в Примере 6,1, использовали для ранжирования фагового дисплея Fab с помощью фагового ИФА.

Дисплей Fab-фрагментов оценивали в фаговом ИФА с использованием двух

различных захватывающих (capture) антител:

(1) Анти-M13 антитело (Amersham #27-9420-01) использовали для захвата фаговых частиц с помощью главного оболочечного белка д8р; поэтому можно определить титр фага.

(2) Использовали анти-Fd антитело (Binding Site #PC075), которое связывается с экспонируемым Fab; поэтому захватываются только фаги, экспонирующие Fabs, содержащие основные гены.

Соответствующие захватывающие антитела иммобилизовали на черных 96-луночных планшетах Maxisorp™ путем распределения 100 мкл раствора антител в концентрации 7,5 мкг/мл для анти-M13 антитела и в концентрации 1,0 мкг/мл для анти-Fd антитела в различные лунки, запечатывания планшета ламинированной фольгой и инкубирования в течение ночи при 4°C.На следующие сутки планшеты дважды промывали TBST и каждую лунку блокировали 300 мкл CTBST в течение 1 ч при комнатной температуре.

Оба фаговых супернатанта и эталонные образцы переносили для детекции следующим образом. Блокированные ИФА планшеты промывали дважды TBST. 100 мкл соответствующим образом разведенных фаговых супернатантов в CTBST переносили из планшетов для разведения в покрытые планшеты для ИФА, инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре и промывали 5x TBST. Добавляли 100 мкл/лунку конъюгата анти-M13 с пероксидазой (Amersham), разведенного 1:5000 в CTBST, и инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Рабочий раствор Quanta Blu (Pierce) готовили путем смешивания 1 части (например 0,5 мл) раствора перекиси с 9 частями (например 4,5 мл) раствора субстрата и уравновешивали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин. ИФА планшеты промывали 5x TBST, добавляли 100 мкл/лунку рабочего раствора QuantaBlu. Флуоресценцию измеряли после инкубации в течение примерно 2 мин (возбуждение: 320 нм, излучение: 430 нм) и далее с интервалами 5 мин.

Оценку данных ИФА выполняли следующим образом: калибровочные кривые получали с использованием препарата эталонного фага HuCAL GOLD (VH3 каппа+ лямбда) и рассчитывали титры фаговых супернатантов и контролей. Для каждого образца титр по анти-Fd делили на титр по анти-M13 (анти-pVIII), полученное соотношение представляло собой относительный уровень экспонирования (relative display rate).

Поскольку относительный уровень экспонирования Fab рассчитывали с использованием внутреннего стандарта (HuCAL GOLD препарат фага VH3 каппа+ лямбда), который не является общедоступным. Относительный уровень экспонирования оценивали в виде ранжирования. Посредством ранжирования относительных значений экспонирования специалист может воспроизводить вышеупомянутый способ, используя любой контроль. Например, каждая пара белков эмбрионального типа демонстрирует количество по сравнению с контролем. Поэтому пары белков эмбрионального типа, имеющие наиболее высокий относительный уровень экспонирования по сравнению с контролем, также имеют наиболее высокий относительный уровень экспонирования по сравнению с любым контролем, несмотря на то, что конкретный относительный уровень экспонирования, по-видимому, будет отличаться. Поэтому ранжирование значений создавали с использованием относительных данных экспонирования, показаных на Фиг.55, также показанных в Таблице 32, где данные располагались от самых высоких до самых низких значений. Это ранжирование показано в Таблице 26. Из этих пар белков эмбрионального типа, имеющих относительный уровень экспонирования в пределах верхних 10%, 20%, 30%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%

и 90%, можно идентифицировать тестируемые Fabs.

Конкретно, из 400 протестированных пар относительные значения экспонирования были получены для 196 пар, см. Таблицу 26. Поэтому специалист может точно определить, какие пары белков эмбрионального типа находятся в пределах верхних 10%, 20%, 30%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80% или 90% тестируемых Fabs. Например, верхние 75% включают пары белков эмбрионального типа, ранжированные как №№1-147 в Таблице 26.

Таблица 26: Ранжирование относительных значений экспонирования Fab

№	VH	VL	Относительный дисплей Fab (цис-дисплей)
1	hVH_3_11	hVK_1_39	29,0
2	hVH_3_07	hVK_1_39	27,3
3	hVH_3_15	hVK_3_11	19,4
4	hVH_3_23	hVK_1_27	17,1
5	hVH_3_33	hVL_2-23	17,1
6	hVH_3_15	hVL_1-40	16,7
7	hVH_3_30	hVL_3-21	16,6
8	hVH_3_21	hVK_1_06	16,1
9	hVH_3_53	hVK_1_12	14,8
10	hVH_3_15	hVK_1_16	14,5
11	hVH_3_07	hVK_3_15	14,5
12	hVH_3_07	hVK_1_27	14,5
13	hVH_3_15	hVK_1_39	14,2
14	hVH_3_23	hVL_2-11	13,6
15	hVH_3_23	hVK_3_20	13,3
16	hVH_3_30	hVK_1_39	13,1
17	hVH_3_15	hVL_1-47	13,0
18	hVH_3_07	hVK_2_30	13,0
19	hVH_3_11	hVL_1-40	12,4
20	hVH_3_33	hVK_3_15	12,3
21	hVH_3_15	hVK_3_15	12,1
22	hVH_3_48	hVK_3_15	12,1
23	hVH_3_21	hVL_3-21	11,8
24	hVH_3_15	hVK_1_06	11,7
25	hVH_3_21	hVK_1_39	11,6
26	hVH_3_15	hVK_1_12	11,5
27	hVH_3_07	hVL_2-14	11,3
28	hVH_3_21	hVK_1_12	11,3
29	hVH_3_53	hVK_1_05	11,1
30	hVH_3_15	hVL_1-51	11,0
31	hVH_3_23	hVK_1_39	10,8
32	hVH_3_53	hVK_1_16	10,7
33	hVH_3_07	hVK_1_12	10,6

34	hVH_3_15	hVL_2-11	10,5
35	hVH_3_07	hVK_1_17	10,5
36	hVH_3_11	hVK_1_16	10,3
37	hVH_3_48	hVL_1-47	10,3
38	hVH_3_23	hVL_1-51	10,2
39	hVH_3_15	hVL_2-23	10,1
40	hVH_3_21	hVK_1_05	10,0
41	hVH_3_15	hVK_1_09	10,0
42	hVH_3_74	hVK_3_15	10,0
43	hVH_3_11	hVL_3-21	9,8
44	hVH_3_15	hVL_2-14	9,7
45	hVH_3_53	hVK_3_15	9,6
46	hVH_3_30	hVL_2-23	9,5
47	hVH_3_74	hVK_1_06	9,5
48	hVH_3_15	hVL_3-1	9,4
49	hVH_3_48	hVL_2-23	9,3
50	hVH_3_15	hVL_3-21	9,2
51	hVH_3_30	hVK_1_27	9,1
52	hVH_3_23	hVL_2-14	9,1
53	hVH_3_48	hVK_1_27	8,9
54	hVH_3_15	hVK_3_20	8,9
55	hVH_3_11	hVL_2-23	8,9
56	hVH_3_21	hVL_2-23	8,8
57	hVH_3_74	hVL_1-40	8,8
58	hVH_3_30	hVL_3-1	8,8
59	hVH_3_74	hVK_1_39	8,7
60	hVH_3_48	hVK_1_16	8,7
61	hVH_3_74	hVK_1_09	8,7
62	hVH_3_21	hVK_1_27	8,7
63	hVH_3_74	hVK_1_12	8,4
64	hVH_3_11	hVL_2-11	8,4
65	hVH_3_23	hVK_1_16	8,4
66	hVH_3_53	hVK_1_09	8,3
67	hVH_4_04*03	hVL_1-47	8,3
68	hVH_3_11	hVK_1_12	8,2
69	hVH_3_07	hVL_1-40	8,2
70	hVH_3_15	hVK_1_05	8,1
71	hVH_3_11	hVL_1-47	8,1
72	hVH_3_74	hVK_1_16	8,0
73	hVH_3_15	hVK_1_27	7,8
74	hVH_3_23	hVL_2-23	7,4
75	hVH_3_23	hVL_3-21	7,4
76	hVH_3_53	hVL_2-11	7,2

77	hVH_6_1	hVL_1-40	7,2
78	hVH_3_74	hVL_1-51	7,1
79	hVH_3_74	hVL_3-1	7,0
80	hVH_3_07	hVK_1_16	7,0
81	hVH_3_07	hVL_2-23	6,9
82	hVH_3_53	hVK_1_27	6,9
83	hVH_3_11	hVK_1_09	6,7
84	hVH_3_07	hVK_1_09	6,7
85	hVH_3_21	hVL_2-14	6,5
86	hVH_3_74	hVK_1_05	6,4
87	hVH_3_11	hVL_2-14	6,4
88	hVH_3_15	hVK_1_17	6,4
89	hVH_3_53	hVL_1-51	6,4
90	hVH_3_53	hVL_2-23	6,3
91	hVH_3_07	hVL_1-47	6,3
92	hVH_3_23	hVK_1_09	6,1
93	hVH_3_48	hVL_3-1	6,0
94	hVH_3_11	hVK_1_27	6,0
95	hVH_6_1	hVK_1_09	5,9
96	hVH_1_46	hVL_1-51	5,7
97	hVH_3_11	hVK_1_05	5,5
98	hVH_3_30	hVK_1_12	5,4
99	hVH_1_46	hVL_3-21	5,2
100	hVH_4_04*03	hVL_3-21	5,2
101	hVH_3_53	hVL_3-1	5,1
102	hVH_3_07	hVL_3-1	5,0
103	hVH_3_74	hVK_1_27	5,0
104	hVH_3_21	hVK_1_17	5,0
105	hVH_3_74	hVL_2-14	4,7
106	hVH_3_11	hVK_3_15	4,6
107	hVH_3_23	hVL_3-1	4,6
108	hVH_1_69*01	hVL_3-21	4,6
109	hVH_4_04*03	hVK_1_09	4,5
110	hVH_1_18	hVL_3-1	4,4
111	hVH_1_18	hVL_2-23	4,3
112	hVH_1_46	hVL_3-1	4,3
113	hVH_3_11	hVK_1_06	4,3
114	hVH_3_23	hVK_2_30	4,1
115	hVH_5_51	hVL_3-1	3,8
116	hVH_1_18	hVK_1_39	3,7
117	hVH_5_51	hVK_1_39	3,7
118	hVH_3_73	hVK_1_27	3,6
119	hVH_4_39	hVL_3-1	3,6

120	hVH_1_69*01	hVK_1_39	3,5
121	hVH_1_69*01	hVL_3-1	3,4
122	hVH_1_18	hVL_3-21	3,4
123	hVH_6_1	hVK_1_06	3,3
124	hVH_4_04*03	hVK_1_16	3,2
125	hVH_3_74	hVL_1-47	3,2
126	hVH_1_46	hVK_3_15	3,0
127	hVH_5_51	hVL_2-23	3,0
128	hVH_1_46	hVK_1_09	3,0
129	hVH_1_69*01	hVK_1_06	2,9
130	hVH_3_53	hVK_1_17	2,9
131	hVH_1_46	hVL_2-23	2,7
132	hVH_4_04*03	hVL_2-23	2,7
133	hVH_5_51	hVK_1_09	2,6
134	hVH_1_18	hVK_3_15	2,6
135	hVH_1_46	hVK_1_39	2,5
136	hVH_1_18	hVL_2-14	2,5
137	hVH_1_18	hVL_1-40	2,4
138	hVH_4_04*03	hVL_3-1	2,2
139	hVH_1_18	hVK_3_20	2,2
140	hVH_4_39	hVK_1_39	2,1
141	hVH_1_69*01	hVK_1_05	2,1
142	hVH_5_51	hVL_2-14	2,1
143	hVH_1_69*01	hVK_1_12	2,1
144	hVH_6_1	hVL_2-23	2,1
145	hVH_4_39	hVL_2-14	2,0
146	hVH_1_18	hVK_1_05	2,0
147	hVH_1_18	hVK_1_16	2,0
148	hVH_1_18	hVL_2-11	1,9
149	hVH_1_18	hVK_2_30	1,9
150	hVH_5_51	hVK_3_15	1,9
151	hVH_5_51	hVK_1_12	1,8
152	hVH_1_69*01	hVL_2-23	1,8
153	hVH_3_74	hVL_3-21	1,8
154	hVH_4_39	hVK_1_06	1,6
155	hVH_1_46	hVL_2-11	1,6
156	hVH_1_69*01	hVK_3_15	1,6
157	hVH_1_18	hVK_1_12	1,6
158	hVH_6_1	hVK_1_12	1,5
159	hVH_4_31	hVL_3-1	1,4
160	hVH_1_46	hVK_1_16	1,3
161	hVH_3_53	hVK_2_30	1,3
162	hVH_5_51	hVK_1_16	1,3

163	hVH_1_46	hVK_1_17	1,3
164	hVH_1_69*01	hVK_1_16	1,2
165	hVH_1_18	hVK_1_27	1,2
166	hVH_6_1	hVL_2-11	1,0
167	hVH_1_69*01	hVK_1_17	0,9
168	hVH_4_39	hVL_2-23	0,9
169	hVH_5_51	hVK_2_30	0,9
170	hVH_1_69*01	hVL_2-11	0,8
171	hVH_3_73	hVL_2-23	0,8
172	hVH_4_39	hVK_1_17	0,7
173	hVH_4_39	hVL_1-40	0,6
174	hVH_1_18	hVK_1_06	0,6
175	hVH_3_73	hVK_3_11	0,5
176	hVH_3_73	hVK_1_05	0,4
177	hVH_5_51	hVK_1_27	0,4
178	hVH_6_1	hVL_3-21	0,4
179	hVH_3_73	hVL_3-21	0,4
180	hVH_1_2	hVL_3-1	0,4
181	hVH_4_04*03	hVK_2_30	0,3
182	hVH_3_73	hVK_1_06	0,3
183	hVH_3_73	hVL_1-51	0,3
184	hVH_3_73	hVK_1_09	0,3
185	hVH_3_73	hVK_1_12	0,3
186	hVH_3_73	hVK_1_16	0,3
187	hVH_3_73	hVK_1_39	0,2
188	hVH_3_73	hVK_3_15	0,2
189	hVH_3_73	hVL_2-11	0,2
190	hVH_1_69*01	hVK_1_27	0,2
191	hVH_1_2	hVL_2-11	0,1
192	hVH_1_2	hVK_1_05	0,1
193	hVH_1_2	hVK_1_16	0,1
194	hVH_3_73	hVK_1_17	0,1
195	hVH_1_2	hVK_1_06	0,1
196	hVH_1_2	hVL_2-14	0,1

На Фиг.55 показаны относительные уровни дисплея для большинства 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL.

Пример 6.3: ИФА скрининг 400 комбинаций VH/VL для определения уровня экспрессии Fab в лизатах E.coli

Эталонные планшеты (MP, Masterplates) инокулировали выбранными клонами, трансформированными пулами комбинаций VH/VL в Fab-экспрессирующем векторе pJP×1 (показаны на Фиг.49) в 2YT/Cam/1%Gluc среде на лунку. Эти планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи при встряхивании. Планшеты для экспрессии (EP) инокулировали с помощью 2,5 мкл культур из MPs в 2YT/Cam/0,1%глюкозы на лунку. Контроли (см. Таблицу 27) инокулировали из глицериновых концентратов. Эти планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C при встряхивании, затем экспрессию

Fab индуцировали путем добавления IPTG (изопропилтиогалактозид) и инкубировали при 22°C в течение ночи при встряхивании. Лизаты клеток E.coli получали путем добавления буфера борная кислота/EOTA/лизоцим к EPs (1 ч инкубации при 22°C, встряхивание) и бактериальные лизаты затем блокировали с помощью 12,5% MPBST, встряхивая по меньшей мере в течение 30 мин при комнатной температуре. Лизаты E.coli из планшетов для экспрессии разбавляли соответственно в 0,5% MPBS и использовали в следующем

анализе.

В Таблице 27 показаны используемые немеченые покрывающие (coating) антитела и AP-меченые детектирующие антитела.

Таблица 27:

	MOR название	Маркер	Хозяин	Антитело	Фирма	Номер	Конц-я	Разведение	Партия
Покрывающее Ab	15	немеченое	овца	IgG против человека (Fd)	Binding Site	pc075	12,1 мг/мл	1:1000	236366, Эксп.2009/10
Детектирующее Ab	AP27	AP	мышь	анти-FlagM2	Sigma	A9469	1,1 мг/мл	1:5000	048K6143, новый лот

В Таблице 28 описаны используемые контроли.

Таблица 28:

#	Название конструкции
3	pM×11FH VH1-69 VLAVI1-40 AYA
5	pM×11FH VH3-23 VLAVk3-11 AYA
пустой BEL	pM×9_APStufferFHClone1 (не содержащий Fab-молекул!)

Скрининг ИФА включал следующие стадии: Покрытие 384 лунок планшета MaxiSorp с помощью Fd-специфических антител против IgG человека, разведенных в PBS, и инкубацию в течение ночи при 4°C. На следующие сутки планшеты промывали 2×PBST и блокировали путем добавления (5% сухого молока в PBS) в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при к.т. при встряхивании. Затем планшеты снова промывали PBST и добавляли предварительно блокированные лизаты E.coli, разбавляя в 0,5% MPBS, и инкубировали в течение 1 ч при встряхивании при к.т. Также добавляли контроли #3 и #5. Планшеты затем промывали PBST, и AP-меченое детектирующее антитело разбавляли в 0,5% MPBS. Добавляли разведенное детектирующее антитело и затем инкубировали в течение 1 ч при к.т.при осторожном встряхивании. Сигнал определяли следующим образом:

промывали лунки TBST и добавляли 20 мкл AttoPhos (разведенный 1:5 в ddHzO) и считывали при 5 мин и 7-8 мин с использованием Tecan (infiniTe F200), программа PrimeScreen.

Относительные уровни экспрессии Fab рассчитывали путем деления ИФА сигнала соответствующей пары VH/VL на ИФА сигнал эталонного Fab pMx11FH VH1-69 VLA_VI1-40 AYA. Таким образом, одинаково высокие ИФА сигналы дают относительный уровень экспрессии Fab, равный 1. Эталонный Fab экспрессируется в плазмидах pMORPHXH (показаны на Фиг.50), содержащих: а) модифицированную сигнальную последовательность тяжелой цепи phoA, содержащую C-концевой сайт рестрикции Nhel; б) модифицированную сигнальную последовательность легкой цепи ompA, содержащую C-концевой сайт рестрикции Nhel; в) белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи гена эмбрионального типа VH1-69* 01, как показано на Фиг.45A, г) белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области легкой цепи гена эмбрионального типа IGLV1-40, как

показано на Фиг.47A; д) включение CDR-H3 (WGGDGFYAMDY) из антитела hu4D5-8, и белковой последовательности эмбрионального типа JH4 для FR4 тяжелой цепи; е) включение участка CDR-L3 (QSYDSSLSGV5) и белковой последовательности эмбрионального типа JI2/3 для FR4 легкой цепи. hu4D5-8 описан в Carter P. et al. (1992) "Humanization of an anti-pi 85Her2 antibody for human cancer therapy" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289). Все гены созданы в Geneart (Regensburg, Германия).

Результаты показаны на Фиг.56.

Пример 6.4: ИФА скрининг 400 комбинаций VH/VL для определения термостабильности Fab в BEL лизатах

Планшеты для экспрессии готовили, как в Примере 6.3. Разведенные лизаты E.coli из планшетов для экспрессии инкубировали при различных температурах в течение 45 минут и использовали в следующем анализе.

В Таблице 29 показаны используемые немеченые покрывающие антитела и AP-меченые детектирующее антитела.

Таблица 29:

	Название MOR	Маркер	Хозяин	Антитело	Фирма	Номер	Конц-я	Разведение	Партия
Покрывающее Ab	57	немеченое	мышь	моноклональное антиполи Гистидин Антитело IgG1 (анти-6x-Гистидин); полипептиды, содержащие полигистидиновую метку	R&D Systems	MAB050	500 мкг/мл	1:250	AEJ708111
Детектирующее Ab	AP30	AP	коза	каппа-легкие цепи против человека	Sigma	A3813	2,3 мг/мл	1:2300	018K6069
Детектирующее Ab	AP5	AP	коза	лямбда-легкие цепи против человека	Sigma	A2904	0,8 мг/мл	1:800	096K6030

ИФА скрининг включал следующие стадии: на 384 лунок планшета MaxiSorp наносили покрывающие антитела (см. таблицу выше), разведенные в PBS. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C.На следующей день планшеты промывали PBST и блокировали путем добавления 5% MPBS в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при к.т.при встряхивании. Затем разведенные лизаты E.coli из планшетов для экспрессии распределяли в четыре 96-луночных ПЦР-планшета (каждый примерно 40 мкл) и подвергали воздействию различных температур (4°C (на льду), 60°C, 70°C, 80°C и затем на льду) в ПЦР-циклере, каждая температура в течение 45 мин. Блокированные 384-луночные планшеты промывали PBST, затем в планшеты добавляли предварительно инкубированные Fab лизаты. Планшеты затем инкубировали 1 ч при к.т.при встряхивании. Планшеты промывали PBST, AP-меченые детектирующие антитела разбавляли в 0,5% MPBS. Добавляли 20 мкл/лунку разведенных детектирующих антител и инкубировали в течение 1 ч при к.т.при осторожном встряхивании. Сигнал определяли следующим образом:

промывали лунки TBST и во все лунки добавляли AttoPhos (разведенный 1:5 в ddH_2O). Сигнал считывали в различные временные точки (от 5 мин до 10 мин), используя Tecan (infiniTe F200), программу PimeScreen.

Результаты показаны на Фиг.57.

Пример 6.5: ИФА скрининг 400 комбинаций VH/VL для определения сывороточной стабильности Fab в лизатах E.coli

Планшеты для экспрессии готовили, как в Примере 6.3. Лизаты E.coli, содержащие Fab, разбавляли и инкубировали в сыворотке крупного рогатого скота и мышей с использованием следующих стадий: лизаты E.coli из планшетов для экспрессии разбавляли в 50% сыворотке (общий объем 100 мкл), добавляли 1:1000 Cam для

предотвращения роста бактерий и лизаты разделяли на два 96-луночных планшета и оба планшета замораживали. Первый планшет размораживали и инкубировали при 37°C в течение 12-13 суток. Второй планшет хранили при -80°C до проведения ИФА (0 суток инкубации при 37°C).

В Таблице 30 показаны используемые немеченые покрывающие антитела и AP-меченые детектирующие антитела.

Таблица 30:

	Название MOR	Маркер	Хозяин	Антитело	Фирма	Номер	Конц-я	Разведение	Партия
Покрывающее Ab	36	Fab	коза	IgG против человека (H+L)	Jackson Immuno Research	109-006-088	1,3 мг/мл	1:1000	80299
Детектирующее Ab	AP3O	AP	коза	каппа-легкие цепи против человека	Sigma	A3813	2,3 мг/мл	1:2300	018K6069
Детектирующее Ab	AP5	AP	коза	лямбда-легкие цепи против человека; связанное+свободное	Sigma	A2904	0,8 мг/мл	1:800	096K6030

На 11-е или 12-е сутки на 384 лунок планшета MaxiSorp наносили 20 мкл покрывающего антитела, разведенного в PBS. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C.На следующие сутки планшеты промывали PBST и блокировали путем добавления 5% MPBS в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при к.т.при встряхивании. Затем блокированные 384-луночные планшеты промывали PBST. Лизаты E.coli в сыворотке из образцов при -80°C и 37°C переносили в покрытые ИФА планшеты и инкубировали в течение 1 часа при к.т. при встряхивании. Планшеты промывали PBST и AP-меченые детектирующие антитела разбавляли в 0,5% MPBS. Добавляли AP-меченые детектирующие антитела и планшет инкубировали в течение 1 ч при к.т. при встряхивании. Сигнал идентифицировали следующим образом: промывали лунки TBST и во все лунки добавляли AttoPhos (разведенный 1:5 в ddHzO). Сигнал считывали в различные временные точки (от 5 мин до 10 мин), используя Tecan (infiniTe F200), программу PrimeScreen.

Результаты тестирования стабильности в сыворотке крупного рогатого скота показаны на Фиг.58. Результаты тестирования стабильности в мышиной сыворотке показаны на Фиг.59.

Пример 7: Создание iqg для оценки биофизических свойств

Для создания 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL, 20 генов вариабельной области тяжелой цепи субклонировали в вектор экспрессии человеческого IgG1 pJP_hIgG1, показанный на Фиг.52. Одновременно 12 генов вариабельной области каппа-цепи субклонировали в вектор экспрессии каппа-легкой цепи млекопитающих pJP_hlgkappa, показанный на Фиг.53, и 8 генов вариабельной области лямбда-цепи субклонировали в вектор экспрессии лямбда-легкой цепи млекопитающих pJPJ-ilglambda, показанный на Фиг.54.

Путем котрансфекции каждой экспрессирующей плазмиды для тяжелой цепи и легкой цепи все 400 пар VH/VL могут быть получены отдельно посредством клонирования только 40 экспрессирующих конструкций. Таким образом, все 20 конструкций тяжелой цепи котрансфицировали с каждой из экспрессирующих конструкций для легкой цепи в клетки HEK.EBNA. Человеческий IgG1 собирали или определяли через несколько суток после трансфекции из супернатантов клеточных культур.

Пример 7.1: Ранжирование экспрессии IgG

Одним из критереев для выбора спариваний VH/VL, подлежащих включению в библиотеку, является уровень экспрессии 400 различных спариваний VH/VL в IgG-

формате. Уровень экспрессии каждого спаривания VH/VL в формате человеческого IgG1 оценивали с помощью "сэндвич"-ИФА. Поэтому все 400 комбинаций VH/VL в формате человеческого IgG1 трансфицировали в клетки HEK.EBNA и экспрессировали в небольшом масштабе. Супернатанты клеточной культуры собирали через несколько суток и оценивали уровень IgG.

Выполняли следующую процедуру. 384-луночные планшеты MaxiSorpTM покрывали Fcγ-пан R10Z8E9 мышиным антителом против человеческого IgG при 2,5 мкг/мл в PBS. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C.Планшеты промывали PBST. Планшеты блокировали 5% БСА (бычий сывороточный альбумин) или 1x Chemiblocker в PBST и инкубировали в течение 1 ч при к.т. при встряхивании и снова промывали PBST. Супернатанты, экспрессирующие IgG, разбавляли в 2,5% БСА-PBST, и разбавленные образцы добавляли к блокированному и промытому ИФА планшету. Использовали следующие контроли: пустой супернатант и супернатанты со слабо экспрессирующими антителами, умеренно экспрессирующими антителами и высоко экспрессирующими антителами. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты затем промывали TBST. Добавляли соответственно разведенный Fcγ-пан R10Z8E9 конъюгат мышиного антитела против человеческого IgG с биотином в 1% БСА-TBST. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при при комнатной температуре. Планшеты промывали TBST. Добавляли стрептавидин-AP, разведенный 1:2000 в 0,5% БСА-TBST, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали TBST. Добавляли флуоресцентный субстрат AttoPhosTM (приготовленный согласно инструкциям производителя), разведенный в TBST непосредственно перед использованием. Через 5 и 10 мин измеряли флуоресценцию с помощью микропланшет-ридера Тесап.

Относительные уровни экспрессии IgG1 рассчитывали путем деления ИФА сигнала соответствующей пары VH/VL на ИФА сигнал эталонного IgG1 MOR03080 (показанный в Таблице 31). Таким образом, одинаково высокие ИФА сигналы дают относительный уровень экспрессии IgG1, равный 1.

Таблица 31

Аминокислотная последовательность MOR03080 следующая:

03080 Вариабельная область тяжелой цепи с CDR, выделенными жирным шрифтом:

(1) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYGMH**WVRQAPGKGLEWVS**N**

(51) **IYSDGSNTFY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**NM**

(101) **YRWPFHYFFDY**WGQGTLVTVSS

03080 Вариабельная область легкой цепи с CDR, выделенными жирным шрифтом:

(1) DIELTQPPSV SVAPGQTARISC**SGDNIGNKYVS**WYQQKPGQAPVVVIY**GD**

(51) **NNRPS**GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSYDSSYF**VFGGG

(101) TKLTVLGQ

Результаты показаны на Фиг.60.

Пример 7.2: Ранжирование стабильности lqG1 в сыворотке

Одним из критериев для выбора спариваний вариабельных областей тяжелых и вариабельных областей легких цепей, подлежащих включению в библиотеку, является стабильность в сыворотке 400 различных спариваний вариабельных областей тяжелых и вариабельных областей легких цепей в IgG-формате. Стабильность в сыворотке каждого супернатанта IgG антитела оценивали путем инкубации в 50% мышиной сыворотке в течение 14 суток и последующего "сэндвич"-ИФА с мышиным антителом против человеческого IgG (CH2), клон R10Z8E9. Снова все 400 комбинаций VH/VL в формате человеческого IgG1 трансфицировали в клетки HEK.EBNA и экспрессировали в небольшом масштабе. Супернатанты клеточных культур собирали через несколько суток и IgG в супернатанте тестировали на стабильность в сыворотке.

Выполняли следующую процедуру. 384-луночный планшет MaxiSorpTM покрывали Fcy-пан R10Z8E9 мышиным антителом против человеческого IgG при 2,5 мкг/мл в PBS. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C.Планшеты промывали PBST и затем блокировали 5% БСА-PBST или 1x Chemiblocker в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали PBST. Супернатанты клеточной культуры, содержащие IgG1, разбавляли: а) в 2,5% БСА-PBST и б) в 50% мышиной сыворотке и инкубировали при 37°C в течение по меньшей мере14 суток, и эти образцы добавляли в блокированный и промытый ИФА планшет.Использовали следующие контроли: пустой супернатант и Супернатанты со слабо экспрессирующими антителами, умеренно экспрессирующими антителами и высоко экспрессирующими антителами. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали TBST. Добавляли Fcy-пан R10Z8E9 конъюгат мышиного антитела против человеческого IgG с биотином, разведенный до 0,8 мкг/мл в 1% БСА-TBST. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали TBST. Добавляли стрептавидин-AP, разведенный 1:2000 в 0,5% БСА-TBST. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали TBST. Добавляли флуоресцентный субстрат AttoPhosTM (приготовленный согласно инструкциям производителя), разведенный 1:5 в TBST непосредственно перед использованием. Через 5 и 10 мин измеряли флуоресценцию с помощью микропланшет-ридера Тесап.

Результаты показаны на Фиг.61.

Пример 8: Выбор пар VH/VL с предпочтительными биофизическими свойствами для включения в коллекцию

После тестирования 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL в отношении следующих свойств: а) относительный уровень экспонирования после продукции фага и фагового ИФА в Fab-формате; б) относительные уровни экспрессии Fab после продукции Fab в E.coli, лизиса клеток E.coli и ИФА-детекции продуцируемого Fab; в) термостабильность Fab после продукции Fab в E.coli, лизиса клеток E coli и ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации при повышенных температурах; г) стабильность Fab из лизатов E.coli в сыворотке крупного рогатого скота/мышей посредством ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей; д) относительные уровни экспрессии человеческого IgG1 после продукции IgG1 в клетках млекопитающих и ИФА-детекции секретируемого IgG1 в супернатантах клеточных культур; и е) стабильность человеческого IgG1 в сыворотке крупного рогатого скота, как определено посредством ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей; затем следующая стадия заключалась в выборе пар эмбрионального типа VH/VL, подлежащих включению в коллекцию.

Результаты функционального тестирования для каждой пары белков эмбрионального типа VH/VL показаны в Таблице 32.

Таблица 32: Сбор функциональных данных для каждой из 400 пар генов эмбрионального типа VH/VL

№	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке KPC	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке KPC
1	hVH_1_2	hVK_1_05	0.1	0.0	bg	U	S	10	0.0	bg
2	hVH_1_2	hVK_1_06	0.1	0.2	60	S	S	42	0.0	bg
3	hVH_1_2	hVK_1_09	0.0	0.0	bg	U	S	11	0.0	bg
4	hVH_1_2	hVK_1_12	0.0	0.0	bg	S	S	20	0.0	bg
5	hVH_1_2	hVK_1_16	0.1	0.0	bg	S	S	20	0.0	bg
6	hVH_1_2	hVK_1_17	0.0	0.0	bg	S	S	21	0.0	bg
7	hVH_1_2	hVK_1_27	0.0	0.1	bg	S	S	22	0.0	bg
8	hVH_1_2	hVK_1_39	0.0	0.0	bg	S	S	21	0.0	bg
9	hVH_1_2	hVK_2_30		0.0	bg	S	S	20	0.0	bg
10	hVH_1_2	hVK_3_11	0.0	0.0	bg	S	S	20	0.0	bg
11	hVH_1_2	hVK_3_15	0.0	0.0	bg	U	S	10	0.0	bg
12	hVH_1_2	hVK_3_20		0.0	bg	S	S	21	0.0	bg
13	hVH_1_2	hVL_1-40						0	0.3	bg
14	hVH_1_2	hVL_1-47	0.0	0.0	4	U	U	2	0.0	bg
15	hVH_1_2	hVL_1-51	0.0	0.0	4	U	U	0	0.4	bg
16	hVH_1_2	hVL_2-11	0.1	0.0	4	S	S	22	0.3	bg
17	hVH_1_2	hVL_2-14	0.1	0.0	4	U	U	0	0.1	bg
18	hVH_1_2	hVL_2-23	0.0	0.0	4	U	U	0	0.0	bg
19	hVH_1_2	hVL_3-1	0.4	0.0	4	U	U	1	0.0	bg
20	hVH_1_2	hVL_3-21	0.0	0.0	4	U	U	0	0.0	bg
21	**hVH_1_18**	**hVK_1_05**	**2.0**	**0.4**	**60**	**S**	**S**	**54**	**0.4**	**S**
22	hVH_1_18	hVK_1_06	0.6	0.5	60	S	S	56	0.2	S
23	hVH_1_18	hVK_1_09						0	0.1	S
24	hVH_1_18	hVK_1_12	1.6	0.5	60	S	S	56	0.1	bg
25	hVH_1_18	hVK_1_16	2.0					3	0.2	S
26	hVH_1_18	hVK_1_17		0.5		S	S	38	0.3	S
27	hVH_1_18	hVK_1_27	1.2	0.4	70	S	S	62	0.5	S
28	hVH_1_18	hVK_1_39	3.7	0.3	60	S	S	53	0.1	S
29	hVH_1_18	hVK_2_30	1.9	0.5	60	S	S	56	0.0	S
30	hVH_1_18	hVK_3_11		0.6	60	S	S	56	0.0	S
31	hVH_1_18	hVK_3_15	2.6	0.5	70	S	S	67	0.3	S
32	hVH_1_18	hVK_3_20	2.2	0.9	60	S	S	72	0.0	S
33	hVH_1_18	hVL_1-40	2.4					4	0.5	S
34	hVH_1_18	hVL_1-47		0.8	60	S	S	66	0.4	U
35	hVH_1_18	hVL_1-51						0	0.5	S
36	hVH_1_18	hVL_2-11	1.9					3	0.5	U
37	hVH_1_18	hVL_2-14	2.5	0.6	60	S	S	64	0.5	U
38	**hVH_1_18**	**hVL_2-23**	**4.3**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**70**	**0.4**	**S**
39	hVH_1_18	hVL_3-1	4.4	0.6	60	S	S	65	0.2	U
40	hVH_1_18	hVL_3-21	3.4	0.6	60	S	S	64	0.2	S
41	hVH_1_46	hVK_1_05		0.4	60	S	S	51	0.9	S
42	hVH_1_46	hVK_1_06						0	0.9	S
43	**hVH_1_46**	**hVK_1_09**	**3.0**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**63**	**0.4**	**S**
44	hVH_1_46	hVK_1_12		0.5	60	S	S	55	0.2	S
45	hVH_1_46	hVK_1_16	1.3	0.6	60	S	S	61	0.3	S
46	hVH_1_46	hVK_1_17	1.3					2	0.5	S
47	hVH_1_46	hVK_1_27						0	0.6	S
48	**hVH_1_46**	**hVK_1_39**	**2.5**	**0.4**	**60**	**S**	**S**	**55**	**0.5**	**S**
49	hVH_1_46	hVK_2_30		0.2	4	U	S	16	0.0	S

№	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке КРС	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке КРС
50	hVH_1_46	hVK_3_11						0	0.1	S
51	**hVH_1_46**	**hVK_3_15**	**3.0**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**68**	**0.4**	**S**
52	hVH_1_46	hVK_3_20						0	0.1	S
53	hVH_1_46	hVL_1-40		1.0	60	S	S	73	0.9	S
54	hVH_1_46	hVL_1-47						0	0.6	U
55	hVH_1_46	hVL_1-51	5.7					10	0.3	S
56	hVH_1_46	hVL_2-11	1.6					3	0.3	S
57	hVH_1_46	hVL_2-14						0	0.3	U
58	hVH_1_46	hVL_2-23	2.7	1.0	60	S	S	79	0.3	S
59	hVH_1_46	hVL_3-1	4.3					7	0.4	S
60	hVH_1_46	hVL_3-21	5.2					9	0.3	S
61	**hVH_1_69*01**	**hVK_1_05**	**2.1**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**59**	**0.9**	**S**
62	hVH_1_69*01	hVK_1_06	2.9					5	0.5	S
63	hVH_1_69*01	hVK_1_09		0.3	60	S	U	37	0.4	S
64	hVH_1_69*01	hVK_1_12	2.1	0.4	60	S	S	53	0.3	S
65	hVH_1_69*01	hVK_1_16	1.2					2	0.4	S
66	hVH_1_69*01	hVK_1_17	0.9	0.3	4	S	S	31	0.3	S
67	hVH_1_69*01	hVK_1_27	0.2	0.3	70	S	S	56	0.4	S
68	hVH_1_69*01	hVK_1_39	3.5	0.1	4	S	S	31	0.4	U
69	hVH_1_69*01	hVK_2_30						0	0.0	S
70	hVH_1_69*01	hVK_3_11		0.7	60	S	S	60	0.0	S
71	hVH_1_69*01	hVK_3_15	1.6	0.5	70	S	S	66	0.5	S
72	hVH_1_69*01	hVK_3_20		0.5	60	S	S	54	0.0	S
73	hVH_1_69*01	hVL_1-40		1.0	60	S	S	72	0.2	S
74	hVH_1_69*01	hVL_1-47						0	0.2	U
75	hVH_1_69*01	hVL_1-51		0.8	60	S	S	64	0.3	S
76	hVH_1_69*01	hVL_2-11	0.8	0.7	60	S	S	65	0.2	S
77	hVH_1_69*01	hVL_2-14		0.8	60	S	S	64	0.3	U
78	hVH_1_69*01	hVL_2-23	1.8					3	0.3	S
79	hVH_1_69*01	hVL_3-1	3.4	0.7		S	S	52	0.2	S
80	hVH_1_69*01	hVL_3-21	4.6	0.7	60	S	S	71	0.1	S
81	hVH_3_07	hVK_1_05		0.7	60	S	S	63	0.9	U
82	hVH_3_07	hVK_1_06		0.9	60	S	S	69	1.3	S
83	**hVH_3_07**	**hVK_1_09**	**6.7**	**0.4**	**60**	**S**	**S**	**50**	**1.5**	**S**
84	**hVH_3_07**	**hVK_1_12**	**10.6**	**0.9**	**70**	**S**	**S**	**97**	**0.9**	**S**
85	hVH_3_07	hVK_1_16	7.0					12	1.5	S
86	hVH_3_07	hVK_1_17	10.5	0.5	4	S	S	40	0.9	S
87	**hVH_3_07**	**hVK_1_27**	**14.5**	**0.5**	**70**	**S**	**S**	**87**	**1.8**	**S**
88	hVH_3_07	hVK_1_39	27.3	0.3	60	U	S	85	1.2	S
89	hVH_3_07	hVK_2_30	13.0					0	0.3	S
90	hVH_3_07	hVK_3_11						0	0.4	S
91	**hVH_3_07**	**hVK_3_15**	**14.5**	**0.7**	**70**	**S**	**S**	**95**	**1.8**	**S**
92	hVH_3_07	hVK_3_20						0	0.4	S
93	hVH_3_07	hVL_1-40	8.2					14	0.3	S
94	**hVH_3_07**	**hVL_1-47**	**6.3**	**1.2**	**60**	**S**	**S**	**90**	**0.8**	**U**
95	hVH_3_07	hVL_1-51		1.0	60	S	S	74	0.9	S
96	hVH_3_07	hVL_2-11						0	1.2	S
97	hVH_3_07	hVL_2-14	11.3					19	0.8	U
98	**hVH_3_07**	**hVL_2-23**	**6.9**	**0.8**	**60**	**S**	**S**	**76**	**0.7**	**S**
99	**hVH_3_07**	**hVL_3-1**	**5.0**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**64**	**1.2**	**S**

No.	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке КРС	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке КРС
100	hVH_3_07	hVL_3-21		0.7	60	S	S	61	0.3	S
101	**hVH_3_11**	**hVK_1_05**	**5.5**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**65**	**0.5**	**S**
102	**hVH_3_11**	**hVK_1_06**	**4.3**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**64**	**1.4**	**S**
103	hVH_3_11	hVK_1_09	6.7					0	0.9	S
104	**hVH_3_11**	**hVK_1_12**	**8.2**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**73**	**0.9**	**S**
105	**hVH_3_11**	**hVK_1_16**	**10.3**	**0.6**	**60**	**S**	**U**	**61**	**1.2**	**S**
106	hVH_3_11	hVK_1_17						0	0.9	S
107	hVH_3_11	hVK_1_27	6.0					0	1.7	S
108	hVH_3_11	hVK_1_39	29.0					50	1.8	S
109	hVH_3_11	hVK_2_30		0.4	4	S	S	34	1.1	U
110	hVH_3_11	hVK_3_11	0.0					0	0.6	S
111	**hVH_3_11**	**hVK_3_15**	**4.6**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**68**	**1.6**	**S**
112	hVH_3_11	hVK_3_20						0	0.2	S
113	hVH_3_11	hVL_1-40	12.4					21	0.3	S
114	**hVH_3_11**	**hVL_1-47**	**8.1**	**0.8**	**60**	**S**	**S**	**80**	**1.3**	**U**
115	hVH_3_11	hVL_1-51		1.1	60	S	S	77	1.9	S
116	hVH_3_11	hVL_2-11	8.4					14	1.1	S
117	hVH_3_11	hVL_2-14	6.4	0.9	60	S	S	81	0.4	U
118	**hVH_3_11**	**hVL_2-23**	**8.9**	**1.0**	**60**	**S**	**S**	**88**	**0.4**	**S**
119	hVH_3_11	hVL_3-1		0.5	60	S	S	53	1.6	S
120	hVH_3_11	hVL_3-21	9.8					17	0.3	S
121	**hVH_3_15**	**hVK_1_05**	**8.1**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**68**	**0.4**	**S**
122	**hVH_3_15**	**hVK_1_06**	**11.7**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**79**	**0.8**	**S**
123	**hVH_3_15**	**hVK_1_09**	**10.0**	**0.5**	**70**	**S**	**S**	**80**	**0.9**	**S**
124	**hVH_3_15**	**hVK_1_12**	**11.5**	**0.7**	**70**	**S**	**S**	**90**	**0.7**	**S**
125	**hVH_3_15**	**hVK_1_16**	**14.5**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**86**	**1.5**	**S**
126	hVH_3_15	hVK_1_17	6.4	0.6	4	U	U	30	0.8	S
127	**hVH_3_15**	**hVK_1_27**	**7.8**	**0.5**	**70**	**S**	**S**	**77**	**1.7**	**S**
128	**hVH_3_15**	**hVK_1_39**	**14.2**	**0.4**	**60**	**S**	**S**	**76**	**1.8**	**S**
129	hVH_3_15	hVK_2_30		0.3	4	S	U	23	0.6	S
130	hVH_3_15	hVK_3_11	19.4					33	0.8	S
131	**hVH_3_15**	**hVK_3_15**	**12.1**	**0.6**	**70**	**S**	**S**	**70**	**1.9**	**S**
132	hVH_3_15	hVK_3_20	8.9					0	0.5	S
133	**hVH_3_15**	**hVL_1-40**	**16.7**	**0.9**	**60**	**S**	**S**	**98**	**0.1**	**S**
134	hVH_3_15	hVL_1-47	13.0	1.2	60	S	S	102	0.2	U
135	**hVH_3_15**	**hVL_1-51**	**11.0**	**1.1**	**60**	**S**	**S**	**94**	**0.9**	**S**
136	**hVH_3_15**	**hVL_2-11**	**10.5**	**0.9**	**60**	**S**	**S**	**88**	**0.8**	**S**
137	hVH_3_15	hVL_2-14	9.7	0.8	60	S	S	83	0.9	U
138	hVH_3_15	hVL_2-23	10.1					17	0.4	S
139	hVH_3_15	hVL_3-1	9.4	0.3	4	S	S	46	1.0	S
140	hVH_3_15	hVL_3-21	9.2	0.8		S	S	65	0.2	S
141	hVH_3_21	hVK_1_05	10.0					17	0.8	S
142	**hVH_3_21**	**hVK_1_06**	**16.1**	**1.0**	**60**	**S**	**S**	**99**	**0.9**	**S**
143	hVH_3_21	hVK_1_09						0	0.4	S
144	**hVH_3_21**	**hVK_1_12**	**11.3**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**77**	**0.5**	**S**
145	hVH_3_21	hVK_1_16		0.9	60	S	S	68	0.0	S
146	hVH_3_21	hVK_1_17	5.0					9	0.0	S
147	**hVH_3_21**	**hVK_1_27**	**8.7**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**78**	**0.5**	**S**
148	**hVH_3_21**	**hVK_1_39**	**11.6**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**54**	**0.8**	**S**
149	hVH_3_21	hVK_2_30		0.6	4	S	S	44	0.1	U

No.	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке КРС	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке КРС
150	hVH_3_21	hVK_3_11						0	0.2	S
151	hVH_3_21	hVK_3_15		0.8	60	S	S	65	0.3	S
152	hVH_3_21	hVK_3_20						0	0.5	S
153	hVH_3_21	hVL_1-40		1.0	60	S	S	72	0.5	S
154	hVH_3_21	hVL_1-47	0.0	1.2	60	S	S	81	0.3	S
155	hVH_3_21	hVL_1-51						0	0.9	S
156	hVH_3_21	hVL_2-11		0.9	60	S	S	68	0.7	S
157	**hVH_3_21**	**hVL_2-14**	**6.5**	**0.9**	**60**	**S**	**S**	**81**	**1.2**	**S**
158	**hVH_3_21**	**hVL_2-23**	**8.8**	**1.0**	**60**	**S**	**S**	**90**	**0.9**	**S**
159	hVH_3_21	hVL_3-1		0.7	60	S	S	60	0.4	S
160	hVH_3_21	hVL_3-21	11.8	0.9	60	S	S	88	0.1	S
161	hVH_3_23	hVK_1_05		0.8	60	S	S	64	0.2	S
162	hVH_3_23	hVK_1_06		0.7	60	S	S	61	0.2	S
163	hVH_3_23	hVK_1_09	6.1	0.8	70	S	S	86	0.1	S
164	hVH_3_23	hVK_1_12		0.9	60	S	S	68	0.1	S
165	hVH_3_23	hVK_1_16	8.4	0.6	60	S	S	72	0.2	S
166	hVH_3_23	hVK_1_17		0.6	4	S	U	31	0.1	S
167	hVH_3_23	hVK_1_27	17.1					29	0.2	S
168	hVH_3_23	hVK_1_39	10.8					19	0.3	S
169	hVH_3_23	hVK_2_30	4.1	0.3	4	S	S	39	0.0	bg
170	hVH_3_23	hVK_3_11						0	0.0	bg
171	hVH_3_23	hVK_3_15		0.7	70	S	S	73	0.4	S
172	hVH_3_23	hVK_3_20	13.3					0	0.2	S
173	hVH_3_23	hVL_1-40						0	0.1	S
174	hVH_3_23	hVL_1-47						0	0.1	S
175	hVH_3_23	hVL_1-51	10.2	1.1	60	S	S	94	0.2	S
176	hVH_3_23	hVL_2-11	13.6					23	0.1	S
177	hVH_3_23	hVL_2-14	9.1					16	0.3	S
178	hVH_3_23	hVL_2-23	7.4	0.9	60	S	S	82	0.3	S
179	hVH_3_23	hVL_3-1	4.6	0.4	60	S	S	60	0.1	S
180	hVH_3_23	hVL_3-21	7.4	0.8	60	S	S	78	0.1	S
181	hVH_3_30	hVK_1_05						0	0.7	S
182	hVH_3_30	hVK_1_06		1.0	60	S	S	75	0.6	S
183	hVH_3_30	hVK_1_09						0	0.3	S
184	hVH_3_30	hVK_1_12	5.4	0.8	60	S	S	73	0.3	S
185	hVH_3_30	hVK_1_16		0.9	60	S	S	69	0.4	S
186	hVH_3_30	hVK_1_17						0	0.5	S
187	hVH_3_30	hVK_1_27	9.1	0.4	60	S	U	38	0.5	S
188	hVH_3_30	hVK_1_39	13.1	0.0	bg	U	U	19	1.0	S
189	hVH_3_30	hVK_2_30		0.4	4	S	U	23	0.1	bg
190	hVH_3_30	hVK_3_11		0.4	60	S	S	50	0.1	S
191	hVH_3_30	hVK_3_15		0.7	60	S	S	61	0.9	S
192	hVH_3_30	hVK_3_20		0.7	60	S	S	63	0.4	S
193	hVH_3_30	hVL_1-40						0	0.8	S
194	hVH_3_30	hVL_1-47		1.1	60	S	S	78	0.3	S
195	hVH_3_30	hVL_1-51						0	0.4	S
196	hVH_3_30	hVL_2-11		0.7	60	S	S	62	0.4	S
197	hVH_3_30	hVL_2-14		0.8	60	S	S	66	1.0	S
198	**hVH_3_30**	**hVL_2-23**	**9.5**	**1.0**	**60**	**S**	**S**	**89**	**0.5**	**S**
199	**hVH_3_30**	**hVL_3-1**	**8.8**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**73**	**0.5**	**S**

No.	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке КРС	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке КРС
200	hVH_3_30	hVL_3-21	16.6	0.8	60	S	S	93	0.2	S
201	hVH_3_33	hVK_1_05		0.3	60	S	S	46	0.0	S
202	hVH_3_33	hVK_1_06						0	0.6	S
203	hVH_3_33	hVK_1_09		0.7	60	S	S	60	0.2	S
204	hVH_3_33	hVK_1_12		0.2	60	S	U	34	0.2	S
205	hVH_3_33	hVK_1_16						0	0.4	S
206	hVH_3_33	hVK_1_17						0	0.5	S
207	hVH_3_33	hVK_1_27		0.6	60	S	S	57	0.2	S
208	hVH_3_33	hVK_1_39						0	0.8	S
209	hVH_3_33	hVK_2_30						0	0.3	S
210	hVH_3_33	hVK_3_11						0	0.6	S
211	**hVH_3_33**	**hVK_3_15**	**12.3**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**77**	**0.9**	**S**
212	hVH_3_33	hVK_3_20		1.0	60	S	S	72	0.3	S
213	hVH_3_33	hVL_1-40						0	1.0	S
214	hVH_3_33	hVL_1-47		1.1	60	S	S	77	0.4	S
215	hVH_3_33	hVL_1-51						0	0.6	S
216	hVH_3_33	hVL_2-11		0.5	60	S	S	54	0.5	S
217	hVH_3_33	hVL_2-14		0.9	4	S	S	53	0.9	S
218	**hVH_3_33**	**hVL_2-23**	**17.1**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**82**	**0.5**	**S**
219	hVH_3_33	hVL_3-1		0.2	60	S	S	44	0.7	S
220	hVH_3_33	hVL_3-21		0.8	60	S	S	67	0.5	S
221	hVH_3_48	hVK_1_05						0	0.6	S
222	hVH_3_48	hVK_1_06						0	0.7	S
223	hVH_3_48	hVK_1_09						0	0.2	S
224	hVH_3_48	hVK_1_12						0	0.3	S
225	hVH_3_48	hVK_1_16	8.7					15	0.5	S
226	hVH_3_48	hVK_1_17						0	0.5	S
227	**hVH_3_48**	**hVK_1_27**	**8.9**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**74**	**0.9**	**S**
228	hVH_3_48	hVK_1_39						0	0.5	S
229	hVH_3_48	hVK_2_30						0	0.3	S
230	hVH_3_48	hVK_3_11						0	0.7	S
231	hVH_3_48	hVK_3_15	12.1					21	0.3	S
232	hVH_3_48	hVK_3_20		0.8	60	S	S	65	0.4	S
233	hVH_3_48	hVL_1-40		0.8		S	S	51	0.6	S
234	hVH_3_48	hVL_1-47	10.3					18	0.4	S
235	hVH_3_48	hVL_1-51		1.2	60	S	S	80	0.7	S
236	hVH_3_48	hVL_2-11						0	0.6	S
237	hVH_3_48	hVL_2-14						0	0.6	S
238	hVH_3_48	hVL_2-23	9.3					16	0.5	S
239	hVH_3_48	hVL_3-1	6.0	0.8		S	S	61	0.5	S
240	hVH_3_48	hVL_3-21						0	0.3	S
241	hVH_3_53	hVK_1_05	11.1	0.7	4	U	S	60	0.8	S
242	hVH_3_53	hVK_1_06		0.7	60	S	S	63	0.7	S
243	**hVH_3_53**	**hVK_1_09**	**8.3**	**0.9**	**60**	**S**	**S**	**83**	**0.4**	**S**
244	**hVH_3_53**	**hVK_1_12**	**14.8**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**60**	**0.2**	**S**
245	hVH_3_53	hVK_1_16	10.7	0.0	bg	bg	U	20	0.3	S
246	hVH_3_53	hVK_1_17	2.9	0.5	4	S	S	42	0.5	S
247	hVH_3_53	hVK_1_27	6.9	0.4	60	S	S	62	0.2	S
248	hVH_3_53	hVK_1_39		0.6	60	S	S	56	0.2	S
249	hVH_3_53	hVK_2_30	1.3	0.3	4	S	S	32	0.0	bg

No.	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке КРС	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке КРС
250	hVH_3_53	hVK_3_11		0.8	60	S	S	64	0.3	S
251	hVH_3_53	hVK_3_15	9.6	0.7	60	S	S	63	0.5	S
252	hVH_3_53	hVK_3_20		0.3	4	S	S	32	0.3	S
253	hVH_3_53	hVL_1-40		1.1	4	S	S	60	1.1	S
254	hVH_3_53	hVL_1-47		1.1	60	S	S	79	0.2	S
255	**hVH_3_53**	**hVL_1-51**	**6.4**	**1.3**	**60**	**S**	**S**	**96**	**0.4**	**S**
256	hVH_3_53	hVL_2-11	7.2	0.8	60	S	S	78	0.3	S
257	hVH_3_53	hVL_2-14		1.0	60	S	S	75	0.8	S
258	**hVH_3_53**	**hVL_2-23**	**6.3**	**1.1**	**60**	**S**	**S**	**86**	**0.6**	**S**
259	**hVH_3_53**	**hVL_3-1**	**5.1**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**67**	**0.5**	**S**
260	hVH_3_53	hVL_3-21		0.8	60	S	S	66	0.5	S
261	hVH_3_73	hVK_1_05	0.4	0.2	60	S	S	45	1.1	S
262	hVH_3_73	hVK_1_06	0.3	0.2	60	S	S	45	1.0	S
263	hVH_3_73	hVK_1_09	0.3	0.1	60	S	S	39	0.9	S
264	hVH_3_73	hVK_1_12	0.3	0.1	60	S	S	38	0.5	S
265	hVH_3_73	hVK_1_16	0.3	0.2	60	S	S	44	1.1	S
266	hVH_3_73	hVK_1_17	0.1					0	1.0	S
267	hVH_3_73	hVK_1_27	3.6	0.1	4	S	S	24	0.9	S
268	hVH_3_73	hVK_1_39	0.2	0.2	4	S	S	27	0.8	S
269	hVH_3_73	hVK_2_30		0.1	bg	S	S	22	0.3	S
270	hVH_3_73	hVK_3_11	0.5					0	0.2	S
271	hVH_3_73	hVK_3_15	0.2	0.1	60	S	S	39	0.1	S
272	hVH_3_73	hVK_3_20						0	1.1	S
273	hVH_3_73	hVL_1-40		0.1	60	S	S	40	1.2	S
274	hVH_3_73	hVL_1-47	0.0	0.3	4	S	S	31	0.8	S
275	hVH_3_73	hVL_1-51	0.3	0.2	60	S	S	44	0.7	S
276	hVH_3_73	hVL_2-11	0.2	0.2	4	S	S	26	0.8	S
277	hVH_3_73	hVL_2-14						0	0.4	S
278	hVH_3_73	hVL_2-23	0.8					1	0.1	S
279	hVH_3_73	hVL_3-1	0.0	0.1	60	S	S	39	1.0	S
280	hVH_3_73	hVL_3-21	0.4	0.2	60	S	S	43	1.1	S
281	hVH_3_74	hVK_1_05	6.4					11	0.6	S
282	**hVH_3_74**	**hVK_1_06**	**9.5**	**0.9**	**60**	**S**	**S**	**86**	**1.0**	**S**
283	**hVH_3_74**	**hVK_1_09**	**8.7**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**74**	**0.5**	**S**
284	hVH_3_74	hVK_1_12	8.4	0.6	60	S	S	74	0.0	S
285	hVH_3_74	hVK_1_16	8.0					11	0.8	S
286	hVH_3_74	hVK_1_17		0.6	60	S	S	58	0.2	S
287	**hVH_3_74**	**hVK_1_27**	**5.0**	**0.6**	**70**	**S**	**S**	**77**	**1.1**	**S**
288	hVH_3_74	hVK_1_39	8.7					15	0.3	S
289	hVH_3_74	hVK_2_30		0.4		S	S	37	0.7	S
290	hVH_3_74	hVK_3_11						0	0.1	S
291	**hVH_3_74**	**hVK_3_15**	**10.0**	**0.8**	**70**	**S**	**S**	**94**	**1.0**	**S**
292	hVH_3_74	hVK_3_20		0.7	60	S	S	62	0.6	S
293	hVH_3_74	hVL_1-40	8.8	0.4	4	S	S	51	1.3	S
294	hVH_3_74	hVL_1-47	3.2	1.2		S	S	72	0.6	S
295	**hVH_3_74**	**hVL_1-51**	**7.1**	**1.1**	**60**	**S**	**S**	**91**	**1.2**	**S**
296	hVH_3_74	hVL_2-11		0.6	60	S	S	59	0.8	S
297	hVH_3_74	hVL_2-14	4.7					8	0.6	S
298	hVH_3_74	hVL_2-23						0	1.0	S
299	hVH_3_74	hVL_3-1	7.0	0.6	60	S	S	70	0.3	S

No.	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке KPC	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке KPC
300	hVH_3_74	hVL_3-21	1.8	0.6	60	S	S	60	0.3	S
301	hVH_4_04*03	hVK_1_05		0.8	60	S	S	67	0.6	S
302	hVH_4_04*03	hVK_1_06		0.8	60	S	S	64	1.1	S
303	hVH_4_04*03	hVK_1_09	4.5	0.1	bg	S	S	30	0.6	S
304	hVH_4_04*03	hVK_1_12		0.7	60	S	S	61	0.8	S
305	hVH_4_04*03	hVK_1_16	3.2	0.2	60	S	S	48	0.4	S
306	hVH_4_04*03	hVK_1_17		0.4	4	S	S	34	0.8	S
307	hVH_4_04*03	hVK_1_27		0.4	60	S	S	48	0.9	S
308	hVH_4_04*03	hVK_1_39		0.2	bg	S	S	26	1.0	S
309	hVH_4_04*03	hVK_2_30	0.3	0.5	4	S	S	38	0.2	U
310	hVH_4_04*03	hVK_3_11		0.6	bg	S	S	43	0.3	S
311	hVH_4_04*03	hVK_3_15		0.6	60	S	S	58	1.1	S
312	hVH_4_04*03	hVK_3_20		1.1	60	S	U	65	1.1	S
313	hVH_4_04*03	hVL_1-40		1.0	60	S	S	75	0.9	S
314	hVH_4_04*03	hVL_1-47	8.3					14	0.4	S
315	hVH_4_04*03	hVL_1-51		0.9	60	S	S	71	0.6	S
316	hVH_4_04*03	hVL_2-11		1.0	60	S	S	73	0.7	S
317	hVH_4_04*03	hVL_2-14		0.7	60	S	S	63	0.4	S
318	**hVH_4_04*03**	**hVL_2-23**	**2.7**	**1.0**	**60**	**S**	**S**	**77**	**0.7**	**S**
319	**hVH_4_04*03**	**hVL_3-1**	**2.2**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**63**	**1.3**	**S**
320	**hVH_4_04*03**	**hVL_3-21**	**5.2**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**69**	**0.5**	**S**
321	hVH_4_31	hVK_1_05		0.0	bg	S	S	21	0.0	bg
322	hVH_4_31	hVK_1_06						0	0.2	bg
323	hVH_4_31	hVK_1_09		0.1	4	S	S	23	0.6	S
324	hVH_4_31	hVK_1_12		0.1	60	S	S	37	0.4	S
325	hVH_4_31	hVK_1_16		0.0	bg	S	S	20	0.0	bg
326	hVH_4_31	hVK_1_17		0.0	bg	U	bg	1	0.2	bg
327	hVH_4_31	hVK_1_27		0.0	bg	S	S	20	0.0	bg
328	hVH_4_31	hVK_1_39		0.8	60	S	S	65	0.5	S
329	hVH_4_31	hVK_2_30		0.0	bg	S	S	20	0.0	bg
330	hVH_4_31	hVK_3_11						0	0.0	bg
331	hVH_4_31	hVK_3_15		0.1	bg	S	S	24	0.1	S
332	hVH_4_31	hVK_3_20						0	0.4	S
333	hVH_4_31	hVL_1-40	0.0	0.6	60	S	S	57	0.8	S
334	hVH_4_31	hVL_1-47	0.0	0.7	60	S	S	62	0.1	S
335	hVH_4_31	hVL_1-51		0.9	60	S	S	70	0.3	S
336	hVH_4_31	hVL_2-11		0.5	60	S	S	55	0.2	S
337	hVH_4_31	hVL_2-14	0.0					0	0.5	S
338	hVH_4_31	hVL_2-23		0.0	60	S	S	37	0.3	S
339	hVH_4_31	hVL_3-1	1.4	0.3	60	S	S	50	1.3	S
340	hVH_4_31	hVL_3-21		0.4	60	S	S	50	0.4	bg
341	hVH_4_39	hVK_1_05	0.0	0.3	60	S	S	45	0.3	S
342	hVH_4_39	hVK_1_06	1.6					3	0.8	S
343	hVH_4_39	hVK_1_09		0.5	4	S	S	37	0.7	S
344	hVH_4_39	hVK_1_12						0	0.9	S
345	hVH_4_39	hVK_1_16						0	0.5	S
346	hVH_4_39	hVK_1_17	0.7	0.3	4	S	S	33	1.0	S
347	hVH_4_39	hVK_1_27						0	0.4	S
348	hVH_4_39	hVK_1_39	2.1	0.3	60	S	S	48	1.2	S
349	hVH_4_39	hVK_2_30		0.2	4	S	S	27	0.2	S

No.	VH	VL	Отн. дисплей Fab (CysDisplay)	Отн. экспрессия Fab	Термо-стабильность Fab	Стабильность Fab в сыв-ке мыши	Стабильность Fab в сыв-ке КРС	Ранж. значение Fab	Отн. экспрессия IgG1	Стабильность IgG1 в сыв-ке КРС
350	hVH_4_39	hVK_3_11		0.3	60	S	S	48	0.2	S
351	hVH_4_39	hVK_3_15		0.6	70	S	S	68	1.0	S
352	hVH_4_39	hVK_3_20		0.6	60	S		49	1.2	S
353	hVH_4_39	hVL_1-40	0.6	0.9	70	S	S	81	1.1	S
354	hVH_4_39	hVL_1-47		0.7	70	S	S	72	0.3	S
355	hVH_4_39	hVL_1-51		0.8	60	S	S	65	0.5	S
356	hVH_4_39	hVL_2-11						0	0.3	S
357	**hVH_4_39**	**hVL_2-14**	**2.0**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**63**	**0.5**	**S**
358	hVH_4_39	hVL_2-23	0.9	0.7	60	S	S	62	0.4	S
359	**hVH_4_39**	**hVL_3-1**	**3.6**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**59**	**0.9**	**S**
360	hVH_4_39	hVL_3-21		0.6	60	S	S	57	0.6	S
361	hVH_5_51	hVK_1_05		0.5	60	S	S	52	0.4	S
362	hVH_5_51	hVK_1_06		0.5	60	S	S	54	0.9	S
363	**hVH_5_51**	**hVK_1_09**	**2.6**	**0.5**	**60**	**S**	**S**	**57**	**0.5**	**S**
364	hVH_5_51	hVK_1_12	1.8					3	0.8	S
365	hVH_5_51	hVK_1_16	1.3					2	0.5	S
366	hVH_5_51	hVK_1_17		0.3	4	S	S	32	0.6	S
367	hVH_5_51	hVK_1_27	0.4	0.2	60	S	S	43	1.0	S
368	hVH_5_51	hVK_1_39	3.7	0.3	60	S	S	51	1.2	S
369	hVH_5_51	hVK_2_30	0.9	0.2	4	S		19	0.7	S
370	hVH_5_51	hVK_3_11		1.0	60	S		62	0.6	S
371	hVH_5_51	hVK_3_15	1.9					3	1.2	S
372	hVH_5_51	hVK_3_20						0	1.1	S
373	hVH_5_51	hVL_1-40		1.0	60	S	S	72	1.3	S
374	hVH_5_51	hVL_1-47		1.0	60	S	S	73	0.8	S
375	hVH_5_51	hVL_1-51		1.1	60	S	S	77	0.5	S
376	hVH_5_51	hVL_2-11	0.0	0.7	60	S	S	63	0.3	S
377	hVH_5_51	hVL_2-14	2.1					4	0.8	S
378	**hVH_5_51**	**hVL_2-23**	**3.0**	**1.0**	**60**	**S**	**S**	**79**	**0.7**	**S**
379	**hVH_5_51**	**hVL_3-1**	**3.8**	**0.7**	**60**	**S**	**S**	**67**	**1.3**	**S**
380	hVH_5_51	hVL_3-21						0	0.7	S
381	hVH_6_1	hVK_1_05		0.7	60	S	S	62	0.0	S
382	**hVH_6_1**	**hVK_1_06**	**3.3**	**0.6**	**60**	**S**	**S**	**64**	**1.2**	**S**
383	hVH_6_1	hVK_1_09	5.9					10	1.3	S
384	hVH_6_1	hVK_1_12	1.5	0.0	bg	U	S	13	1.1	S
385	hVH_6_1	hVK_1_16						0	1.4	S
386	hVH_6_1	hVK_1_17		0.5	60	S	S	54	1.3	S
387	hVH_6_1	hVK_1_27		0.5	70	S	S	63	1.2	S
388	hVH_6_1	hVK_1_39		0.3	60	S	S	45	1.1	S
389	hVH_6_1	hVK_2_30		0.3	4	S	S	32	0.3	S
390	hVH_6_1	hVK_3_11						0	0.9	S
391	hVH_6_1	hVK_3_15		0.7	70	S	S	70	1.3	S
392	hVH_6_1	hVK_3_20		0.9	60	S	S	70	1.3	S
393	hVH_6_1	hVL_1-40	7.2					12	1.4	S
394	hVH_6_1	hVL_1-47		1.1	60	S	S	75	0.2	S
395	hVH_6_1	hVL_1-51		1.1	60	S	S	75	0.5	S
396	hVH_6_1	hVL_2-11	1.0	1.0	60	S	S	73	0.2	S
397	hVH_6_1	hVL_2-14						0	0.4	S
398	**hVH_6_1**	**hVL_2-23**	**2.1**	**0.8**	**60**	**S**	**S**	**69**	**0.4**	**S**
399	hVH_6_1	hVL_3-1		0.5	60	S	S	55	1.4	S
400	hVH_6_1	hVL_3-21	0.4	0.8	60	S	S	66	0.5	S

Как описано в предыдущих примерах, преобладающие гены эмбрионального типа VH и VL и преобладающие пары генов эмбрионального типа VH/VL идентифицировали из иммунного репертуара человека и иммунного репертуара интактного человека,

затем преобладающие белковые последовательности эмбрионального типа VH и VL анализировали in silico для того, чтобы выявить белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, имеющие предпочтительные биофизические свойства. Как показано в Таблице 21 и на Фиг.37-38, обычно верхние 20 VH, верхние 8 Vλ и верхние 12 Vκ выбирали для синтеза, комбинирования и последующего функционального анализа. Генные последовательности эмбрионального типа синтезировали и затем комбинировали с целью создания 400 пар белков эмбрионального типа, которые являются типичными для распространенных пар генов эмбрионального типа, находящихся в иммунном репертуаре, где каждая из вариабельных областей имеет предпочтительные биофизические свойства, как определено in silico. 400 пар белков эмбрионального типа VH/VL тестировали в отношении следующих свойств: а) относительный уровень экспонирования после продукции фага и фагового ИФА в Fab-формате; б) относительные уровни экспрессии Fab после продукции Fab в E.coli, лизиса клеток E.coli и ИФА-детекции продуцируемого Fab; в) термостабильность Fab после продукции Fab в E.coli, лизиса клеток E.coli и ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации при повышенных температурах; г) стабильность Fab из лизатов E.coli в сыворотке крупного рогатого скота/мышей посредством ИФА-детекции неденатурированных Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей; д) относительные уровни экспрессии человеческого IgG1 после продукции IgG1 в клетках млекопитающих и ИФА-детекции секретируемых IgG1 из супернатантов клеточных культур; и е) стабильность человеческого IgG1 в сыворотке крупного рогатого скота, как определено посредством ИФА-детекции неденатурированного Fab после инкубации в сыворотке крупного рогатого скота/мышей.

Используя данные, представленные в Таблице 32, специалист в данной области сможет легко идентифицировать пары белков эмбрионального типа, имеющие предпочтительные биофизические свойства.

Как правило, пары белков эмбрионального типа, имеющие пороговое значение для каждого функционального свойства, выбирали для включения в коллекции. Например, в некоторых воплощениях пары белков эмбрионального типа, имеющие все из следующих свойств, были выбраны для включения в коллекцию: 1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fab; 2) уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_VI1-40 AYA; 3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате; 4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C; 5) уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и 6) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C. В Таблице 32 показаны жирным шрифтом и подчеркнуты пары белков эмбрионального типа, имеющие все эти функциональные свойства.

Однако как описано выше, пары белков эмбрионального типа, имеющие одно или более функциональных свойств, можно выбрать для включения в коллекции. В данной заявке создали комплексное ранжирование 400 тестируемых пар белков эмбрионального типа, так что каждую пару белков эмбрионального типа можно ранжировать относительно другой с учетом значения каждого из тестируемых функциональных свойств. Это позволило авторам изобретения выбрать одну или более пар белков эмбрионального типа, имеющих одно или более или все перечисленные функциональные свойства. В некоторых воплощениях коллекции содержат все пары белков

эмбрионального типа, имеющие вышеупомянутые характеристики. В некоторых воплощениях коллекция содержит пары белков эмбрионального типа, имеющие самый высокий совокупный балл для 400 протестированных пар. В некоторых воплощениях пары белков эмбрионального типа, имеющие совокупные баллы в пределах верхних 10%, верхних 20% или верхних 30% из 400 протестированных пар, выбрали для включения в коллекции.

Следует понимать, что описание, конкретные примеры и данные, несмотря на указание конкретных воплощений, даны в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Различные изменения и модификации в пределах настоящего изобретения будут очевидны специалисту из обсуждения, описания и данных, содержащихся в данной заявке, и поэтому рассматриваются как часть изобретения.

Формула изобретения

1. Коллекция антител или их функциональных фрагментов для скрининга антител против терапевтической мишени, где каркасные участки вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи таких антител или функциональных фрагментов содержат белковые последовательности эмбрионального типа пары белков эмбрионального типа, где указанная коллекция антител или их функциональных фрагментов содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере двух различных пар белков эмбрионального типа, и где указанные пары белков эмбрионального типа обладают следующими свойствами:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fab;

2) уровень экспрессии в клетке *E. coli* в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_Vl1-40 AYA, последовательности которых представлены в Таблице 5, Таблице 9, на Фиг. 45A и Фиг. 47A;

3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в клетке HEK.EBNA в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR03080; и

6) стабильность в сыворотке в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C;

и где указанные пары белков эмбрионального типа кодируются парой генов эмбрионального типа и выбраны

из

IGHV1-18 (SEQ ID NO: 65)/IGKV1-05 (SEQ ID NO: 118); IGHV1-18 (SEQ ID NO: 65)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV1-46 (SEQ ID NO: 68)/IGKV1-09 (SEQ ID NO: 121); IGHV1-46 (SEQ ID NO: 68)/IGKV1-39 (SEQ ID NO: 129); IGHV1-46 (SEQ ID NO: 68)/IGKV3-15 (SEQ ID NO: 153); IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 70)/IGKV1-05 (SEQ ID NO: 118); IGHV3-07 (SEQ ID NO: 77)/IGKV1-09 (SEQ ID NO: 121); IGHV3-07 (SEQ ID NO: 77)/IGKV1-12 (SEQ ID NO: 122); IGHV3-07 (SEQ ID NO: 77)/IGKV1-27 (SEQ ID NO: 126); IGHV3-07 (SEQ ID NO: 77)/IGKV3-15 (SEQ ID NO: 153); IGHV3-07 (SEQ ID NO: 77)/IGLV1-47 (SEQ ID NO: 167); IGHV3-07 (SEQ ID NO: 77)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV3-07 (SEQ ID NO: 77)/IGLV3-01 (SEQ ID NO: 176); IGHV3-11 (SEQ ID NO: 79)/IGKV1-05 (SEQ ID NO: 118); IGHV3-11 (SEQ ID NO: 79)/IGKV1-06 (SEQ ID NO: 119); IGHV3-11 (SEQ ID NO: 79)/IGKV1-12 (SEQ ID NO: 122); IGHV3-11 (SEQ ID NO: 79)/IGKV1-16 (SEQ ID NO: 124); IGHV3-11

(SEQ ID NO: 79)/IGKV3-15 (SEQ ID NO: 153); IGHV3-11 (SEQ ID NO: 79)/IGLV1-47 (SEQ ID NO: 167); IGHV3-11 (SEQ ID NO: 79)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGKV1-05 (SEQ ID NO: 118); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGKV1-06 (SEQ ID NO: 119); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGKV1-09 (SEQ ID NO: 121); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81) /IGKV1-12 (SEQ ID NO: 122); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGKV1-16 (SEQ ID NO: 124); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGKV1-27 (SEQ ID NO: 126); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGKV1-39 (SEQ ID NO: 129); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGKV3-15 (SEQ ID NO: 153); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGLV1-40 (SEQ ID NO: 165); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGLV1-51 (SEQ ID NO: 169); IGHV3-15 (SEQ ID NO: 81)/IGLV2-11 (SEQ ID NO: 171); IGHV3-21 (SEQ ID NO: 84)/IGKV1-06 (SEQ ID NO: 119); IGHV3-21 (SEQ ID NO: 84)/IGKV1-12 (SEQ ID NO: 122); IGHV3-21 (SEQ ID NO: 84)/IGKV1-27 (SEQ ID NO: 126); IGHV3-21 (SEQ ID NO: 84) /IGKV1-39 (SEQ ID NO: 129); IGHV3-21 (SEQ ID NO: 84)/IGLV2-14 (SEQ ID NO: 172); IGHV3-21 (SEQ ID NO: 84)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV3-30 (SEQ ID NO: 86)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV3-30 (SEQ ID NO: 86)/IGLV3-1 (SEQ ID NO: 176); IGHV3-33 (SEQ ID NO: 89)/IGKV3-15 (SEQ ID NO: 153); IGHV3-33 (SEQ ID NO: 89)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV3-48 (SEQ ID NO: 93)/IGKV1-27 (SEQ ID NO: 126); IGHV3-53 (SEQ ID NO: 95)/IGKV1-09 (SEQ ID NO: 121); IGHV3-53 (SEQ ID NO: 95)/IGKV1-12 (SEQ ID NO: 122); IGHV3-53 (SEQ ID NO: 95)/IGLV1-51 (SEQ ID NO: 169); IGHV3-53 (SEQ ID NO: 95) /IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV3-53 (SEQ ID NO: 95)/IGLV3-1 (SEQ ID NO: 176); IGHV3-74 (SEQ ID NO: 100)/IGKV1-06 (SEQ ID NO: 119); IGHV3-74 (SEQ ID NO: 100)/ IGKV1-09 (SEQ ID NO: 121); IGHV3-74 (SEQ ID NO: 100)/IGKV1-27 (SEQ ID NO: 126); IGHV3-74 (SEQ ID NO: 100)/IGKV3-15 (SEQ ID NO: 153); IGHV3-74 (SEQ ID NO: 100)/ IGLV1-51 (SEQ ID NO: 169); IGHV4-04 (SEQ ID NO: 102)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV4-04(SEQ ID NO: 102)/IGLV3-1 (SEQ ID NO: 176); IGHV4-04 (SEQ ID NO: 102)/IGLV3-21 (SEQ ID NO: 182); IGHV4-39 (SEQ ID NO: 109)/IGLV2-14 (SEQ ID NO: 172); IGHV4-39 (SEQ ID NO: 109)/IGLV3-1 (SEQ ID NO: 176); IGHV5-51 (SEQ ID NO: 113)/IGKV1-09 (SEQ ID NO: 121); IGHV5-51 (SEQ ID NO: 113)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174); IGHV5-51 (SEQ ID NO: 113)/IGLV3-1 (SEQ ID NO: 176); IGHV6-1 (SEQ ID NO: 115)/IGKV1-06 (SEQ ID NO: 119) и IGHV6-1 (SEQ ID NO: 115)/IGLV2-23 (SEQ ID NO: 174).

2. Коллекция по п.1, где указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,05% в иммунном репертуаре человека.

3. Коллекция по п.1, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат человеческие последовательности.

4. Коллекция по п.1, где указанная коллекция антител или их функциональных фрагментов содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере восьми различных пар белков эмбрионального типа.

5. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере десяти различных пар белков эмбрионального типа.

6. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере пятнадцати различных пар белков эмбрионального типа.

7. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере двадцати различных пар белков эмбрионального типа.

8. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере двадцати пяти различных пар белков эмбрионального типа.

9. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере тридцати различных пар белков эмбрионального типа.

10. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере тридцати пяти различных пар белков эмбрионального типа.

11. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере сорока различных пар белков эмбрионального типа.

12. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере сорока пяти различных пар белков эмбрионального типа.

13. Коллекция по п.4, где указанная коллекция содержит белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере пятидесяти различных пар белков эмбрионального типа.

14. Коллекция по п.1, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат один или более участков, определяющих комплементарность, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа.

15. Коллекция по п.1, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участки FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа.

16. Коллекция по п.1, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участок FR4, выбранный из группы, состоящей из JH4, Jκ1 и JA2/3.

17. Коллекция по п.1, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок HCDR3.

18. Коллекция по п.1, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок LCDR3.

19. Коллекция по п.1, где коллекция содержит 1×10^4 антител или их функциональных фрагментов.

20. Коллекция по п.1, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 60% выбранных Fab.

21. Коллекция по п.1, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_Vl1-40 AYA.

22. Коллекция по п.1, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют термостабильность при 70°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате.

23. Коллекция по п.1, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с MOR03080.

24. Коллекция по любому из пп.1-23, где указанные функциональные фрагменты указанных антител выбраны из группы, состоящей из Fab, $F(ab')_2$, Fab′, Fv и scFv.

25. Коллекция нуклеиновых кислот, кодирующих коллекцию по любому из пп.1-24.

26. Коллекция экспрессирующих векторов, содержащих нуклеиновые кислоты по п.25.

27. Коллекция рекомбинантных клеток-хозяев, содержащая коллекцию нуклеиновых кислот по п.25 или коллекцию векторов по п.26, для продуцирования коллекции по любому из пп.1-24.

28. Коллекция рекомбинантных клеток-хозяев по п.27, где указанные клетки являются прокариотическими или эукариотическими.

29. Коллекция рекомбинантных клеток-хозяев по п.28, которые представляют собой клетки *E. coli* или клетки млекопитающего.

30. Способ получения коллекции антител или их функциональных фрагментов по п.1, включающий стадии:

а) определения пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующих в иммунном репертуаре человека;

б) идентификации пар белков эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, обладающих следующими свойствами:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 75% выбранных Fab;

2) уровень экспрессии в клетке *E. coli* в Fab-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с Fab pMx11_FH VH1-69 VLA_Vl1-40 AYA, последовательности которых представлены в Таблице 5, Таблице 9, на Фиг. 45A и Фиг. 47A;

3) термостабильность при 60°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в клетке HEK.EBNA в IgG-формате по меньшей мере 0,4 по сравнению с MOR3080; и

6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C; и

в) создание коллекции антител или их функциональных фрагментов, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи пар белков эмбрионального типа, идентифицированных на стадии (б).

31. Способ по п.30, где стадия (б) включает стадии:

ба) идентификации пар генов эмбрионального типа вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, присутствующих в концентрации по меньшей мере 0,05% в иммунном репертуаре человека;

бб) создания антител или их функциональных фрагментов, содержащих пары белков эмбрионального типа, идентифицированные на стадии ба); и

бв) оценки следующих свойств указанной пары белков эмбрионального типа:

1) относительный уровень экспонирования в Fab-формате;

2) уровень экспрессии в Fab-формате;

3) термостабильность при 60°C или больше в Fab-формате;

4) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота или мышей в Fab-формате в течение более десяти суток при 37°C;

5) уровень экспрессии в IgG-формате; и

6) стабильность в сыворотке крупного рогатого скота в IgG-формате в течение четырнадцати суток при 37°C.

32. Способ по п.30, где стадия (а) включает следующие стадии:

аа) выделение человеческих B-клеток из образца;

аб) получение кДНК из B-клеток;

ав) ПЦР(полимеразная цепная реакция)-амплификация кДНК из B-клеток;

аг) секвенирование ПЦР-продуктов;

ад) идентификация генов эмбрионального типа каждого ПЦР-продукта.

33. Способ по п.30, где стадия создания коллекции (в) включает следующие стадии:

ва) синтез нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их функциональные фрагменты;

вб) клонирование нуклеиновых кислот в вектор; и

вв) экспрессирование антител или их функциональных фрагментов.

34. Способ по п.30, где указанные пары генов эмбрионального типа присутствуют в концентрации по меньшей мере 0,05% в иммунном репертуаре человека.

35. Способ по п.30, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат человеческие последовательности.

36. Способ по п.30, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат белковые последовательности эмбрионального типа по меньшей мере восьми различных пар белков эмбрионального типа.

37. Способ по п.30, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат один или более участков, определяющих комплементарность, содержащих белковые последовательности эмбрионального типа.

38. Способ по п.30, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3, содержащие белковые последовательности эмбрионального типа.

39. Способ по п.30, где указанные антитела или их функциональные фрагменты содержат участок FR4, выбранный из группы, состоящей из JH4, Jκ1 и JA2/3.

40. Способ по п.30, где антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок HCDR3.

41. Способ по п.30, где антитела или их функциональные фрагменты содержат диверсифицированный участок LCDR3.

42. Способ по п.30, где коллекция содержит 1×10^4 антител или их функциональных фрагментов.

43. Способ по п.30, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют относительный уровень экспонирования в Fab-формате, представляющий собой значение не ниже 60% выбранных Fab.

44. Способ по п.30, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в Fab-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с Fab VH1-69 VLA_Vl1-40 AYA.

45. Способ по п.30, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют термостабильность при 70°C или более в течение по меньшей мере 45 минут в Fab-формате.

46. Способ по п.30, где указанные пары белков эмбрионального типа имеют уровень экспрессии в IgG-формате по меньшей мере 0,6 по сравнению с MOR03080.

47. Способ по любому из пп.30-46, где указанные функциональные фрагменты указанных антител выбраны из группы, состоящей из Fab, $F(ab')_2$, Fab′, Fv и scFv.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МОРФОСИС АГ

<120> КОЛЛЕКЦИЯ И СПОСОБЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> MS091PCT

<140> PCT/EP2010/057507
<141> 2010-05-29

<150> 61/299,401
<151> 2010-01-29

<150> 61/182,350
<151> 2009-05-29

<160> 202

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 1
Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 2
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 2
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 3
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 3
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val Val
1 5 10

<210> 4
<211> 15
<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 4
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 5
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 6
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 7
<211> 63
<212> ДНК
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(63)

<400> 7
atg aaa cag agc acc att gcc ctg gcc ctg ctg ccg ctg ctg ttt acc 48
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15

cca gtg acc aaa gcc 63
Pro Val Thr Lys Ala
20

<210> 8
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Escherichia coli

<400> 8
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr

1 5 10 15

Pro Val Thr Lys Ala
20

<210> 9
<211> 63
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(63)

<400> 9
atg aaa cag agc acc att gcc ctg gcc ctg ctg ccg ctg ctg ttt acc 48
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15

cca gtg gtg cta gcc 63
Pro Val Val Leu Ala
20

<210> 10
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 10
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15

Pro Val Val Leu Ala
20

<210> 11
<211> 63
<212> ДНК
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(63)

<400> 11
atg aaa aaa acc gcc att gcc att gcc gtg gcc ctg gca ggc ttt gcc 48
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

acc gtg gcg cag gcc 63
Thr Val Ala Gln Ala
20

<210> 12
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Escherichia coli

<400> 12
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala
20

<210> 13
<211> 63
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(63)

<400> 13
atg aaa aaa acc gcc att gcc att gcc gtg gcc ctg gca ggc ttt gcc 48
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

acc gtg gca tat gcc 63
Thr Val Ala Tyr Ala
20

<210> 14
<211> 21
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 14
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Tyr Ala
20

<210> 15
<211> 57
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(57)

<400> 15
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtc ctg tcc 57
Val Leu Ser

<210> 16
<211> 19
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 16
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 17
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(57)

<400> 17
atg aag cac ctg tgg ttc ttt ctg ctg ctg gtg gcc gct ccc cgg tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtg cta gcc 57
Val Leu Ala

<210> 18
<211> 19
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 18
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ala

<210> 19
<211> 60
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(60)

<400> 19
atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

ggt gcc tac ggg 60
Gly Ala Tyr Gly
20

<210> 20
<211> 20
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly
20

<210> 21
<211> 60
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(60)

<400> 21
atg gtg ctc cag acc cag gtg ttc atc agc ctg ctg ctg tgg atc agc 48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

ggc gca tat gcg 60
Gly Ala Tyr Ala
20

<210> 22
<211> 20
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 22
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Ala
20

<210> 23
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 23
acaggtgccc actcccaggt gcag 24

<210> 24
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 24
aaggtgtcca gtgtgargtg cag 23

<210> 25
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 25
cccagatggg tcctgtccca ggtgcag 27

<210> 26
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 26
caaggagtct gttccgaggt gcag 24

<210> 27
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 27
gggaattctc acaggagacg a 21

<210> 28
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 28
ggaaggtgtg cacgccgctg gtc 23

<210> 29
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 29
ctgcaaccgg tgtacattcc caggtgcagc tggtgcag 38

<210> 30
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 30
ctgcaaccgg tgtacattcc gaggtgcagc tggtgcag 38

<210> 31
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 31
ctgcaaccgg tgtacattct gaggtgcagc tggtggag 38

<210> 32
<211> 38
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 32
ctgcaaccgg tgtacattct gaggtgcagc tgttggag 38

<210> 33
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 33
ctgcaaccgg tgtacattcc caggtgcagc tgcaggag 38

<210> 34
<211> 40
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 34
ctgcaaccgg tgtacattcc caggtgcagc tacagcagtg 40

<210> 35
<211> 32
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 35
tgcgaagtcg acgctgagga gacggtgacc ag 32

<210> 36
<211> 34
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 36
tgcgaagtcg acgctgaaga gacggtgacc attg 34

<210> 37
<211> 33

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 37
tgcgaagtcg acgctgagga gacggtgacc gtg 33

<210> 38
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 38
gttcggggaa gtagtccttg ac 22

<210> 39
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 39
atgaggstcc cygctcagct gctgg 25

<210> 40
<211> 28
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 40
ctcttcctcc tgctactctg gctcccag 28

<210> 41
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 41
atttctctgt tgctctggat ctctg 25

<210> 42

<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 42
gtttctcgta gtctgctttg ctca 24

<210> 43
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 43
atgacccagw ctccabycwc cctg 24

<210> 44
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 44
gtgctgtcct tgctgtcctg ct 22

<210> 45
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 45
ggtcctgggc ccagtctgtg ctg 23

<210> 46
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 46
ggtcctgggc ccagtctgcc ctg 23

<210> 47
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 47
gctctgtgac ctcctatgag ctg 23

<210> 48
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 48
ggtctctctc scagcytgtg ctg 23

<210> 49
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 49
gttcttgggc caattttatg ctg 23

<210> 50
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 50
ggtccaattc ycaggctgtg gtg 23

<210> 51
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 51
gagtggattc tcagactgtg gtg 23

<210> 52
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 52
caccagtgtg gccttgttgg cttg 24

<210> 53
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 53
ctgctaccgg ttcctgggcc cagtctgtgc tgackcag 38

<210> 54
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 54
ctgctaccgg ttcctgggcc cagtctgccc tgactcag 38

<210> 55
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 55
ctgctaccgg ttctgtgacc tcctatgagc tgacwcag 38

<210> 56
<211> 37
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 56
ctgctaccgg ttctctctcs cagcytgtgc tgactca 37

<210> 57
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 57
ctgctaccgg ttcttgggcc aattttatgc tgactcag 38

<210> 58
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 58
ctgctaccgg ttccaattcy cagrctgtgg tgacycag 38

<210> 59
<211> 28
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 59
ctcctcactc gagggyggga acagagtg 28

<210> 60
<211> 122
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 60
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Met Tyr Arg Trp Pro Phe His Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 61
<211> 108
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 61
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Gly Asp Asn 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 Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 62
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 63
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 63
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ser Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 64
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 64
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile 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 Gly

<210> 65
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 65
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 66
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 66
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr

<210> 67
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 67
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Arg
20 25 30

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

Gly Trp Ile Thr Pro Phe Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 68
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 68
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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

<210> 69
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 69
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ala Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met 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 Ala

<210> 70
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 70
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

<210> 71
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 71
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 Lys 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

<210> 72
<211> 86
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 72
Lys Ser Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Ser Phe Ser Gly Phe Thr
1 5 10 15

Ile Thr Ser Tyr Gly Ile His Trp Val Gln Gln Ser Pro Gly Gln Gly
20 25 30

Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Gly Asn Gly Ser Pro Ser Tyr
35 40 45

Ala Lys Lys Phe Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Arg Asp Met Ser Thr
50 55 60

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

Val Tyr Tyr Tyr Ala Arg
85

<210> 73
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 73
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr

<210> 74
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 74
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala His Arg
100

<210> 75
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 75
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile
100

<210> 76
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 76
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile
100

<210> 77
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 77
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 78
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 78
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp

<210> 79
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 79
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 80
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg

<210> 81
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 81
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr
100

<210> 82
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Met Asn Trp Ala Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg

<210> 83
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 83
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 84
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 84
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

85 90 95

Ala Arg

<210> 85
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 85
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys

<210> 86
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 86
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 87
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 87
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 88
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 88
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys

<210> 89
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 89
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 90
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 90
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Met Asn Trp Val His Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg

<210> 91
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 91
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
50 55 60

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

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Tyr

<210> 92
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 92
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp

<210> 93
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 93
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 94
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 94
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg
100

<210> 95
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 95
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Arg

<210> 96
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 96
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 97
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 97
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Val Ile Tyr Ser Cys Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg

<210> 98
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 98
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His
20 25 30

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg
100

<210> 99
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 99
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg
100

<210> 100
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 100
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 101

<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 101
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Arg Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
50 55 60

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

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

<210> 102
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 102
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys 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

<210> 103
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 103

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 104
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 104
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg

<210> 105
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 105
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg

<210> 106
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 106
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg

<210> 107
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 107
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg

<210> 108
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 108
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 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Arg Gly

<210> 109
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 109
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg

<210> 110
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 110
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Arg

<210> 111
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 111
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg

<210> 112
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 112
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 113
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 113
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg 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 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 114
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 114
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 115
<211> 101
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 115
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg
100

<210> 116
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 116
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 117
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 117
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Pro Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Phe Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 118
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 118
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 119
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 119
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 120
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 120
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

<210> 121
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 121
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

85 90 95

<210> 122
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 122
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 123
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 123
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 124
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 124

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

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

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

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

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

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

<210> 125
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 125
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 126
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 126
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro
85 90 95

<210> 127
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 127
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 128
<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 128
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Pro
85 90 95

<210> 129
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 129
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 130
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 130
Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Thr Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

<210> 131
<211> 95
<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 131
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 132
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 132
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 133
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 133
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 134
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 134
Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 135
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 135
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 136
<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 136
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Pro
85 90 95

<210> 137
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 137
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 138
<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 138
Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 139
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 139
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

<210> 140
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 140
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr Gln Phe Pro
100

<210> 141
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 141
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 142
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 142
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Ile His Leu Pro
100

<210> 143
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 143
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro
100

<210> 144
<211> 101
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 144
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
100

<210> 145
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 145
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Phe Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr Gln Phe Pro
100

<210> 146
<211> 101
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 146
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Ile Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Ala Arg Pro Val
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Asp
85 90 95

Ala Gln Asp Pro Pro
100

<210> 147
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 147
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 148
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 148
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile Gln Leu Pro
100

<210> 149
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 149
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro
100

<210> 150
<211> 101
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 150
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
100

<210> 151
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 151
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Pro Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Pro

<210> 152
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 152
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
85 90 95

<210> 153
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 153
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 154
<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 154
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
20 25 30

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

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

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

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

<210> 155
<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 155
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 156
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 156
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 Gly 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 Pro 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 His
85 90 95

<210> 157
<211> 95
<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 157
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 158
<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 158
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 Gly Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

<210> 159
<211> 101
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 159
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro
100

<210> 160
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 160
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 161
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 161
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 162
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 162
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 163
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 163
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro
85 90 95

<210> 164
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 164
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Arg Gln
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Pro

<210> 165
<211> 100
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 165
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser

<210> 166
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 166
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Pro

<210> 167
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 167
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Pro

<210> 168
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 168
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Gln Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ala Trp Asp Asn Ser
85 90 95

Leu Asn Ala

<210> 169
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 169
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Gly

<210> 170
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 170
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Asn Asn Phe

<210> 171
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 171
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Phe

<210> 172
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 172
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Leu

<210> 173
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 173
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Thr Phe

<210> 174

<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 174
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Ser Thr Phe

<210> 175
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 175
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Phe Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Tyr
20 25 30

Asp His Val Phe Trp Tyr Gln Lys Arg Leu Ser Thr Thr Ser Arg Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Met Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Lys Ser Glu Val Glu Ala Asn Tyr His Cys Ser Leu Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Tyr Thr Phe

<210> 176
<211> 95

<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 176
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 Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Gln Asp Ser Lys 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 Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala
85 90 95

<210> 177
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 177
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Arg Asp Ser 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 Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala
85 90 95

<210> 178
<211> 96
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 178
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala

20 25 30

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

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

<210> 179
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 179
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Val Ala Thr Ala Gln
1 5 10 15

Met Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ala Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Asp Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Pro Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ile Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Pro

<210> 180
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 180
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Met Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Phe Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Ile Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Pro

<210> 181
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 181
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Leu

<210> 182
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 182
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Pro

<210> 183
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 183
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Leu Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Glu Asp Ser Glu Arg Tyr Pro Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Asn Thr Thr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Leu Thr Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Gly Asp Glu Asp Asn Pro
85 90 95

<210> 184
<211> 97
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 184
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Pro

<210> 185
<211> 95
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 185
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Asp Asn Asn Leu
85 90 95

<210> 186
<211> 94
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 186
Ser Ser Gly Pro Thr Gln Val Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Asp Ser Ser Asp Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Tyr Gln Leu Ile Asp Asn His Ala

85 90

<210> 187
<211> 103
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 187
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ala Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ile Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Glu His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30

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

Lys Val Lys Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Met Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Phe Ser
65 70 75 80

Asn Leu Gln Ser Asp Asp Glu Ala Glu Tyr His Cys Gly Glu Ser His
85 90 95

Thr Ile Asp Gly Gln Val Gly
100

<210> 188
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 188
Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Lys Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Ser Asn Thr

<210> 189
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 189
Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Lys Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Gly
85 90 95

Thr Gly

<210> 190
<211> 104
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 190
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ser Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Tyr Tyr Ser Asp Ser Asp Lys Gly Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Met Ile Trp Pro Ser Asn Ala Ser
100

<210> 191
<211> 104
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 191
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ala Ile Trp Tyr Ser Ser Thr Ser
100

<210> 192
<211> 104
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 192
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

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

Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ser
100

<210> 193
<211> 104
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 193
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Leu Gly Ser
20 25 30

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

Leu Leu Ser Tyr Tyr Ser Asp Ser Ser Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ser Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

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

Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ser
100

<210> 194
<211> 102
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 194
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser His Ser Ala Ser Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Thr Cys Met Leu Ser Ser Gly Phe Ser Val Gly Asp
20 25 30

Phe Trp Ile Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Pro Pro Arg Tyr
35 40 45

Leu Leu Tyr Tyr His Ser Asp Ser Asn Lys Gly Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Arg Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Thr Trp His Ser Asn
100

<210> 195

<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 195
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
85 90 95

Ser Asn

<210> 196
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 196
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Leu Leu Tyr Tyr Gly Gly
85 90 95

Ala Gln

<210> 197
<211> 98

<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 197
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

His Tyr Pro Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Leu Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Leu Leu Ser Tyr Ser Gly
85 90 95

Ala Arg

<210> 198
<211> 99
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 198
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Pro Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
35 40 45

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

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

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

Gly Ile Ser

<210> 199
<211> 104
<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 199
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Gly Pro Arg Phe Val Met
35 40 45

Arg Val Gly Thr Gly Gly Ile Val Gly Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro
50 55 60

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

Lys Asn Ile Gln Glu Glu Asp Glu Ser Asp Tyr His Cys Gly Ala Asp
85 90 95

His Gly Ser Gly Ser Asn Phe Val
100

<210> 200
<211> 98
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 200
Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Lys Gly Leu Arg Gln
1 5 10 15

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

Gly Ala Ala Trp Leu Gln Gln His Gln Gly His Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ser Tyr Arg Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser
50 55 60

Ala Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Leu Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala

<210> 201
<211> 103
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 201
Arg Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Ala Arg Leu Pro Cys Thr Leu Ser Ser Asp Leu Ser Val Gly Gly
20 25 30

Lys Asn Met Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu
35 40 45

Phe Leu Tyr His Tyr Ser Asp Ser Asp Lys Gln Leu Gly Pro Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Val Ser Gly Ser Lys Glu Thr Ser Ser Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80

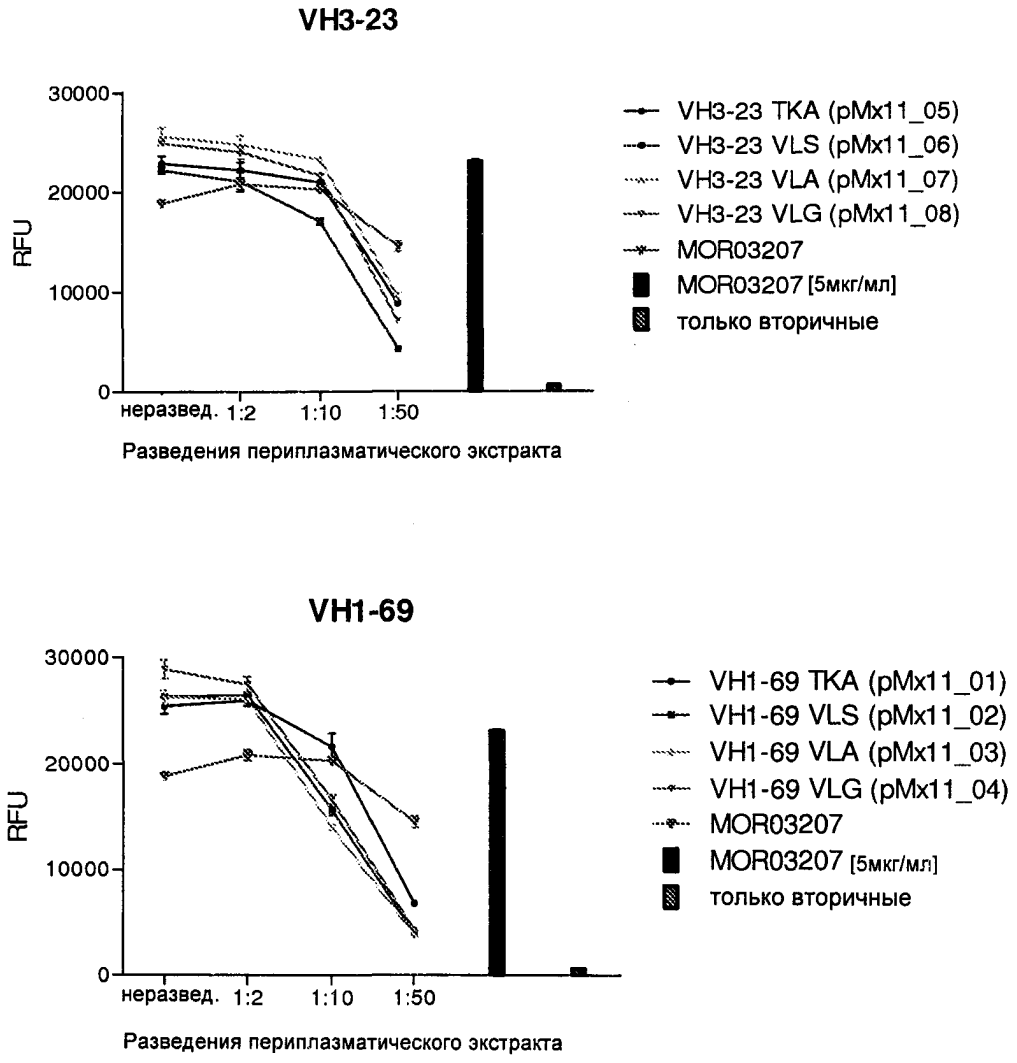
Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gln Val Tyr Glu Ser Ser Ala
100

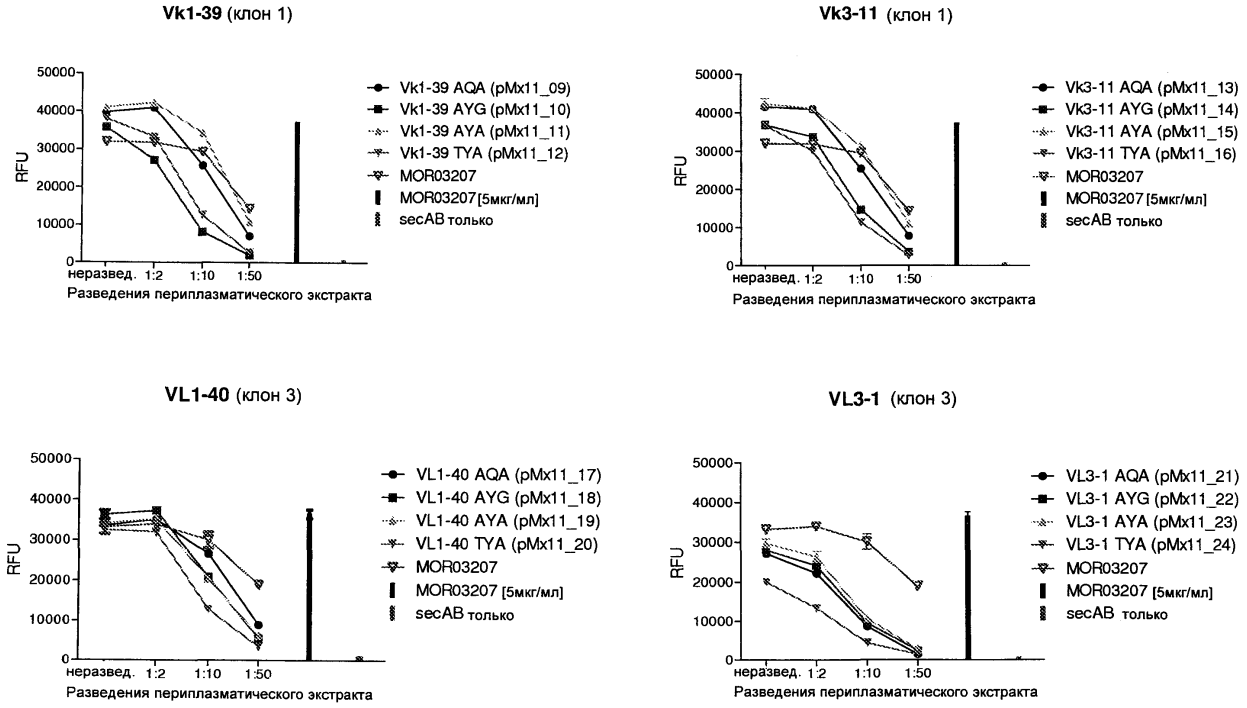
<210> 202
<211> 6
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая 6xHis метка

<400> 202
His His His His His His
1 5

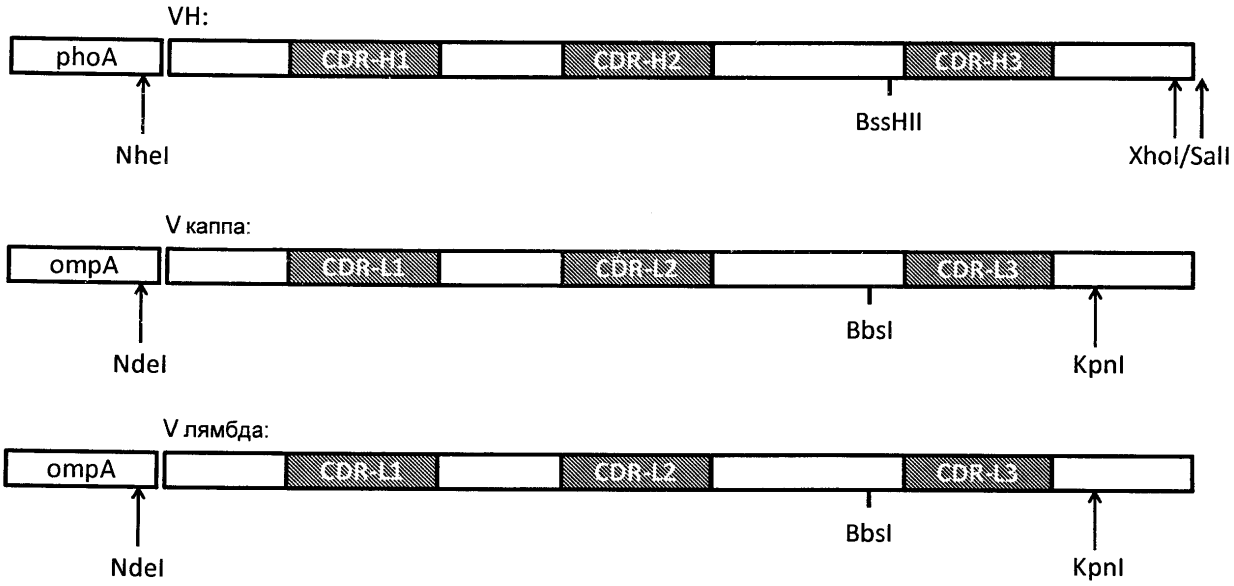

VH3-23
30000
20000
10000
0
RFU
неразвед. 1:2 1:10 1:50
Разведения периплазматического экстракта
VH3-23 TKA (pMx11_05)
VH3-23 VLS (pMx11_06)
VH3-23 VLA (pMx11_07)
VH3-23 VLG (pMx11_08)
MOR03207
MOR03207 [5мкг/мл]
только вторичные
VH1-69
30000
20000
10000
0
RFU
неразвед. 1:2 1:10 1:50
Разведения периплазматического экстракта
VH1-69 TKA (pMx11_01)
VH1-69 VLS (pMx11_02)
VH1-69 VLA (pMx11_03)
VH1-69 VLG (pMx11_04)
MOR03207
MOR03207 [5мкг/мл]
только вторичные

Фиг. 1


Vk1-39 (клон 1)
50000
40000
30000
20000
10000
0
RFU
неразвед. 1:2 1:10 1:50
Разведения периплазматического экстракта
Vk1-39 AQA (pMx11_09)
Vk1-39 AYG (pMx11_10)
Vk1-39 AYA (pMx11_11)
Vk1-39 TYA (pMx11_12)
MOR03207
MOR03207 [5мкг/мл]
secAB только
Vk3-11 (клон 1)
50000
40000
30000
20000
10000
0
RFU
неразвед. 1:2 1:10 1:50
Разведения периплазматического экстракта
Vk3-11 AQA (pMx11_13)
Vk3-11 AYG (pMx11_14)
Vk3-11 AYA (pMx11_15)
Vk3-11 TYA (pMx11_16)
MOR03207
MOR03207 [5мкг/мл]
secAB только
VL1-40 (клон 3)
50000
40000
30000
20000
10000
0
RFU
неразвед. 1:2 1:10 1:50
Разведения периплазматического экстракта
VL1-40 AQA (pMx11_17)
VL1-40 AYG (pMx11_18)
VL1-40 AYA (pMx11_19)
VL1-40 TYA (pMx11_20)
MOR03207
MOR03207 [5мкг/мл]
secAB только
VL3-1 (клон 3)
50000
40000
30000
20000
10000
0
RFU
неразвед. 1:2 1:10 1:50
Разведения периплазматического экстракта
VL3-1 AQA (pMx11_21)
VL3-1 AYG (pMx11_22)
VL3-1 AYA (pMx11_23)
VL3-1 TYA (pMx11_24)
MOR03207
MOR03207 [5мкг/мл]
secAB только

Фиг. 2

RE сайты:



Фиг. 3

Ig	Тяжелая	Легкая
mm-JB	VH	Vκ
mm-JB1	3-23	3-20
mm-JB4	3-15	3-20
mm-JB14	3-23	4-1
mm-JB15	4-39*	2(D)-28
mm-JB17	4-59	3-15
mm-JB18#	3-23	3-11
mm-JB19	1-2	3-20
mm-JB23#	3-30	4-1
mm-JB28	3-72	1-16
mm-JB29	3-23	3-20
mm-JB37	3-30	2-24
mm-JB38	3-30*	1(D)-8
mm-JB40	3-23	3-20
mm-JB43#	3-53*	1-27
mm-JB50	4-59	4-1
mm-JB52	3-33	3-11
mm-JB56	3-15	3-20
mm-JB57	4-34	1(D)-33
mm-JB60#	5-51	2-30
mm-JB65#	1-24	3-11
mm-JB68#	3-72	1-5
mm-JB70#	3-30*	1-5*
mm-JB73#	3-7	2-30
mm-JB75	3-30	3-11
mm-JB76#	4-59	3-15
mm-JB77#	3-30*	3-15
mm-JB86	3-33	2-24
mm-JB90+l	3-30*	2-30
mm-JB	VH	Vλ
mm-JB13#	3-7*	3-1
mm-JB16	3-11	3-1
mm-JB33	1-3*	2-23
mm-JB48	3-33	1-47*
mm-JB62#	3-15	7-43
mm-JB64	3-15	2-18
mm-JB80	3-72	1-51
mm-JB81#	3-11	2-14
mm-JB82	3-53*	2-14*
mm-JB87	3-11	2-8
mm-JB88	3-30	1-44
mm-JB93	4-39*	2-18*

Фиг. 4

Ig	Тяжелая	Легкая
mm-GO	VH	Vк
mm-GO1#	3-30*	1-8
mm-GO12	4-34	1-5
mm-GO14	4-28	1-39
mm-GO15#	3-74	4-1
mm-GO16#	3-21	1-5
mm-GO18	3-21	1-5
mm-GO19#	3-43	3-11
mm-GO26	3-23	1-9*
mm-GO30	4-34	3-15
mm-GO38	4-34	1-5
mm-GO43#	3-23	3-11
mm-GO50	4-39	1-39*
mm-GO68#	3-15	2D28
mm-GO73#	7-81*	4-1
mm-GO75#	3-48	3-20
mm-GO80	3-53*	3-11
mm-GO86	3-30	3(D)-20
mm-GO89#	3-7	1-5
mm-GO93#	3-7*	2-30
mm-5-GO1	3-11	3-15
mm-5-GO2#	3-23	1-5
mm-5-GO14	3-7*	1-5
mm-5-GO20	5-51	1D-39*
mm-5-GO25#	1-3	3-15
mm-5-GO33	3-30*	4-1
mm-5-GO38	3-48	4-1
mm-5-GO39	4-39	1-5
mm-5-GO43	3-53	1-5
mm-5-GO50	4-31*	3-20
mm-5-GO57	5-51	1-5
mm-5-GO65	4-34	1-5
mm-5-GO68#	3-53	3-11
mm-5-GO74	3-23	1(D)-13
mm-5-GO77#	3-23	4-1
mm-5-GO85	4-59	3-20
mm-5-GO86	3-7	3-15
mm-5-GO87	3-30*	1-8
mm-5+GO13#	1-2	1D-39
mm-5+GO18#	1-8	3-15
mm-5+GO26#	1-3	1-6
mm-5+GO43	3-23	3-15
mm-5+GO47#	3-9	3-15
mm-5+GO49#	3-33	3-15
mm-5+GO51#	3-15	4-1
mm-5+GO52#	1-2	3-20
mm-5+GO65#	5-51	1D-39
mm-5+GO66#	3-7	2D-28
mm-5+GO71#	3-23	1-8
mm-5+GO72	3-30	3-20

mm-GO	VH	Vl
mm-GO2#	3-23	1-51
mm-GO9	3-7	2-14*
mm-GO61#	4-31*	2-14
mm-GO79	3-11	4-69*
mm-GO85#	3-9	4-60*
mm-GO88#	4-39	2-8
mm-GO90	1-18	1-44
mm-GO91	4-28	1-51
mm-5-GO30	3-11	2-14*
mm-5-GO37	3-11	1-44
mm-5-GO41#	3-48	2-14*
mm-5-GO44	3-74	2-14*
mm-5-GO47	3-48*	2-11
mm-5-GO49	4-31*	2-14*
mm-5-GO61	3-15	7-46*
mm-5-GO64#	3-7	1-47
mm-5-GO84	3-15	1-40
mm-5-GO91	3-23	1-40
mm-5-GO94	3-23	1-36
mm-5+GO3	1-69*	1-44
mm-5+GO25#	4-59	2-14
mm-5+GO27	4-39	2-14*
mm-5+GO39	3-23	1-44
mm-5+GO57	3-23	2-14*

Фиг. 5

Ig	Тяжелая	Легкая
mm-JH	VH	Vk
mmJH.2 A1	4-59	1-27
mmJH.2 A4#	3-23	1-5*
mmJH.2 A9	4-59	1D-39
mmJH.2 C5	3-23	3-20
mmJH.2 C10#	1-2	1D-39
mmJH.2 C12	3-21	1D-39
mmJH.2 D1	3-23	3-20
mmJH.2 D4	7-81*	1-5*
mmJH.2 D9	3-23	3-15
mmJH.2 D11	3-74	1-5*
mmJH.2 E7	3-11	3-11
mmJH.2 F1	7-81	2D-28
mmJH.2 F7	3-23	3-15
mmJH.2 G3	1-3*	1D-39
mmJH.2 H2	3-23	3-15
mmJH.3 A1	3-74	3-11
mmJH.3 A6	3-23	3-20
mmJH.3 B1#	3-23	4-1
mmJH.3 B2	3-7*	1-5
mmJH.3 B3	3-33	3-11
mmJH.3 B4	3-23	2D-28
mmJH.3 D2	3-21	3-11
mmJH.3 D4	1-18	3-11
mmJH.3 D10	3-72	1-9
mmJH.3 F2	4-59	1D-39
mmJH.3 F3#	3-15	1-9
mmJH.3 G9	3-33	4-1
mm-JH	VH	Vl
mmJH.2 B2	4-31*	1-47*
mmJH.2 B11	4-59	1-44*
mmJH.2 C3	3-9	2-23
mmJH.2 F2	3-23	2-18*
mmJH.2 F3	3-9	2-23
mmJH.2 H3#	3-15	3-1
mmJH.3 A3	7-81*	2-14*
mmJH.3 A5	3-9	2-8
mmJH.3 D1-k	4-4	3-1
mmJH.3 D3	3-7*	3-27
mmJH.3 D9	3-15	7-43
mmJH.3 E10	3-30	2-8
mmJH.3 F1#	3-23	2-14
mmJH.3 F4#	3-7	3-21*
mmJH.3 F9	4-39	1-47*
mmJH.3 G8	3-53	1-44*

Фиг. 6

Ig	Тяжелая	Легкая
m-JB	VH	Vk
m-JB 39+l	4-39	3-15
m-JB 49	1-2	3-20
m-JB 63	4-39	3-20
m-JB 74	3-48	3-20
m-JB 77	5-51	1-39
m-JB 86	4-39	3-15
m-JB 87	3-30	1-9
m-JB	VH	Vl
m-JB 8	1-69	2-8
m-JB 17	3-30	9-49
m-JB 29	4-39	3-1
m-JB 38	3-48	2-14
m-JB 39+k		3-21
m-JB 64	3-9	1-47
m-JB 85	1-18	2-14
m-JB 88	4-39	2-23

Фиг. 7

Ig	Тяжелая	Легкая
m-GO	VH	Vκ
m-GO4	3-7	2D-28
m-GO6	4-59	3-20
m-GO13	3-43	1-5
m-GO15	3-53	1-5
m-GO21	3-15	1-5
m-GO26	3-48	3-11
m-GO40	4-34	3-20
m-GO43	4-34	3-20
m-GO53	4-39	3-15
m-GO56	3-15	3-20
m-GO64	3-30	1-39
m-GO66	3-48	1-39
m-GO75	1-18	1-33
m-GO79	3-30	1-9
m-GO86	4-34	3-20
m-GO88	3-23	2D-28
m-GO119	3-49	3-20
m-GO126	1-46	1-39
m-GO132	4-59	1-39
m-GO162	1-69	1-39
m-GO166	4-39	3-15
m-GO186	1-46	1-9
m-GO191	3-15	1-39
m-GO193	3-48	3-15
m-GO	VH	Vλ
m-GO3	4-28	1-44
m-GO16	4-34	2-14
m-GO19	3-74	3-21
m-GO28	3-23	3-1
m-GO67	3-48	2-14
m-GO76	1-69	2-14
m-GO77	4-39	1-40
m-GO102	4-28	1-36
m-GO113	1-2	1-40
m-GO115	5-51	1-40
m-GO152	3-9	1-44
m-GO157	5-51	1-36
m-GO163	4-34	2-23
m-GO173	3-43	1-51
m-GO189	1-8	2-14

Фиг. 8

Ig	Тяжелая	Легкая
m-JH	VH	Vk
m-JH.1 D4	7-81	3-20
m-JH.1 D12#	4-4	3-15
m-JH.1 E3	4-34	3-20
m-JH.1 F5	3-30	3-15
m-JH.1 F8	3-21	2D-28
m-JH.1 G8	3-48	1D-12
m-JH.1 G10	3-23	3-15
m-JH.1 H5	4-59	3-20
m-JH.1 H11	3-33	2D-28
m-JH.2 A2	3-74	1D-39
m-JH.2 A8	3-7	1-8
m-JH.2 A9	4-31	3-11
m-JH.2 A11	4-61	4-1
m-JH.2 A12#	3-9	1D-8
m-JH.2 B5	7-81	3-20
m-JH.2 C3	3-23	3-20
m-JH.2 C6	3-23	1-9
m-JH.2 C10	4-59	3-15
m-JH.2 D6	3-49	1-17
m-JH.2 D7	3-48	3-15
m-JH.2 E3	1-18	3-20
m-JH.2 E5	4-39	1D-39
m-JH.2 E8	3-9	3-15
m-JH.2 E10#	3-48	3-11
m-JH.2 F3	7-81	3-20
m-JH.2 F9	5-51	3-20
m-JH.2 H12#	3-9	2D-28
m-JH	VH	Vl
m-JH.1 B11	3-23	2-14
m-JH.1 C12	4-59	1-40
m-JH.1 D2	1-18	2-8
m-JH.1 D10	4-59	2-14
m-JH.1 F6	1-8	2-14
m-JH.1 H6	3-9	2-11
m-JH.1 H12#	4-34	3-25
m-JH.2 B12	3-23	2-14
m-JH.2 C8#	1-3	2-14
m-JH.2 C12	4-4	2-14
m-JH.2 D8	3-21	6-57
m-JH.2 E6	3-33	2-11
m-JH.2 F6	1-2	2-14
m-JH.2 G12	5-51	2-14
m-JH.2 H4	4-59	1-40
m-JH.2 H12#		2-14

Фиг. 9

Ig	Тяжелая	Легкая
gmVB	VH	Vκ
VB1	4-59	4-1
VB4	4-39	3-11
VB7#	3-74	3-15
VB10#	4-31*	4-1
VB11#	4-34	2-28
VB23#	4-31*	1-5*
VB26#	3-30	1-13
VB34	3-30	3-20
VB41#	3-15	3-20
VB50	3-11	1-5*
VB52	3-53	1-39
VB54#	3-23	3-20
VB56	3-7*	3-15
VB57	4-31*	3-20
VB58#	4-31*	1-5*
VB60	3-11	3-15
VB65	3-74	1-39
VB68#	5-51	1-5
VB72	3-30	2-28
VB78#	4-31*	3-20
VB83	4-34	1-39
VB86	3-33	1-17
VB92#	1-24	1-39
VB110	4-61	4-1
VB111	3-48	4-1
VB114#	3-74	3-20
VB120#	3-49	1-39
VB121#	3-7*	1-6
VB126	4-39	3D-15
VB129	3-23	1-39
VB132	3-23	1-5*
VB137	3-30	1-5
VB139#	5-51	4-1
VB140	3-21	3-15
VB142	3-33	4-1
VB148	3-33	1-16
VB155	5-51	3-20
VB161	4-61	3-11
VB162	3-48	3-11
VB165	3-30	3-20
VB168	5-51	1-39
VB171#	3-33	3-20
VB174	3-72	1-17
VB176	3-74	3-20
VB179#	3-23	1-17

gmVB	VH	Vλ
VB13	5-51	7-43
VB18	1-46	1-51
VB28	3-23	2-11
VB43	1-69*	2-11
VB45	3-21	2-14
VB53	5-51	2-14
VB70	4-59	1-44
VB73#	3-53	7-46*
VB75	3-21	2-14
VB90#	3-21	4-69
VB101	3-23	1-51
VB102	4-31*	2-11
VB107#	5-51	1-47
VB108	3-64	7-43
VB117#	4-28	2-23
VB138	3-7*	7-46*
VB157	3-30	3-1
VB164	3-7*	1-51
VB173	3-21	1-47

Фиг. 10

Ig	Тяжелая	Легкая
gmPN	VH	Vκ
PN1	1-46	3-15
PN2#	3-7	1-5*
PN4	5-51	1-9
PN8	4-59	4-1
PN13	3-43	2-28
PN16	4-4	1-39
PN30	1-46	1-5*
PN33	4-34	3-11
PN40#	3-48	1-16
PN46	4-34	3-20
PN49#	3-48	1-39
PN52	3-23	4-1
PN53#	3-23	3-11
PN54	4-59	1-12
PN56	3-23	3-20
PN60	3-7	3-20
PN64	3-23	3-20
PN73	1-18	1-39
PN75	5-51	3-15
PN76#	4-59	1-27
PN79	1-46	1-5*
PN83#	3-23	3-11
PN84	3-23	1-5*
PN87	4-39	1-5*
PN89	3-74	2-30
PN102	3-7	3-20
PN116	4-34	1-39
PN117#	3-33	1-39
PN119	1-69*	1-5*
PN120#	1-69	1-27
PN123	1-46	3-11
PN138	3-7	1-39
PN140#	1-8	3-20
PN147#	4-59	2D-30
PN148	4-34	2-28
PN156	1-69	2-28
PN157	4-39	3-20
PN158	3-9	1-17
PN162	1-69*	3-11
PN164	1-69*	3-11
PN167	1-69*	1-6
PN169	3-13	1-9
PN171	1-2	3-20
PN175	1-46	1-9
PN182	4-4	1-39
PN184	4-39	1-5
PN187	3-9	3-11
PN189	3-11	1-5*
PN191	3-15	1-13

gmPN	VH	Vλ
PN7	3-74	7-46
PN14	4-4	1-40
PN18#	3-23	2-14
PN42	3-7	2-8
PN51	5-51	3-21
PN57	4-34	1-40
PN58	4-31*	7-43
PN67	4-59	1-47
PN69	1-8	2-14
PN88	3-15	1-51
PN107	3-7	1-40
PN115	3-7	1-51
PN131	3-21	3-21
PN134#	1-2	1-40
PN139	3-33	3-21
PN153	3-9	1-40
PN161	3-74	3-21
PN192#	3-21	1-44

Фиг. 11

Ig	Тяжелая	Легкая
gmHW	VH	Vκ
HW 106#	4-61	4-1
HW 120	4-31	3-15
HW 149	3-21	1-6
HW 154	3-53	3-15
HW 156	3-7	3-15
HW 161	3-74	3-15
HW 168	4-39	3-15
HW 169	1-18	3-15
HW 175	1-18	3-20
HW 209#	4-39	3-15
HW 221	3-74	3-20
HW 224	3-15	4-1
HW 230	3-7	3-15
HW 247	3-9	3-20
HW 266	3-9	1-5*
HW 285	3-33	1D-39
HW 290	3-15	1-5*
HW 307	4-39	1D-39
HW 311	4-59	3-20
HW 326	3-7	1-5*
HW 329	4-34	3-20
HW 337	4-34	3-20
HW 352	1-3*	3-20
HW 376	4-28	3-20
HW 378	1-46	1-27
HW 386#	3-30	1D-39
HW 387	1-46	3-20

gmHW	VH	Vλ
HW 101#	1-18	2-23*
HW 109	3-30	2-11
HW 124	3-7	1-40
HW 157#	3-23	7-43
HW 158	3-11	2-14
HW 174	7-81	2-14*
HW 177	5-51	1-47*
HW 181	1-46	2-14*
HW 182	4-39	2-14*
HW 205	1-69	2-11
HW 225	3-30	1-40
HW 231	3-21	1-51*
HW 237	3-48	1-47*
HW 248	3-21	1-40
HW 251	3-30	1-51
HW 259	1-46	2-11
HW 296	3-21	2-14*
HW 313	3-33	2-23*
HW 327#	3-9	2-14*
HW 330	3-15	1-40
HW 338#	3-21	1-51
HW 345	4-39	1-51*
HW 355	3-73	6-57
HW 357#	3-33	1-51
HW 360	1-46	2-14*

Фиг. 12

Ig	Тяжелая	Легкая
gm/gp169	VH	Vκ
gm169-3κ	3-48	3-20
gm169-15	1-24	3-11
gm169-16κ	1-8	1-33
gm169-20κ	3-7	4-1
gm169-22κ	3-23	3-15
gm169-24κ	4-4	2-28
gm169-28κ	3-33	1-5
gm169-31κ	3-66	1-39
gm169-34κ#	4-4	1-39
gm169-38κ	3-23	3-15
gm169-42	3-33	1-5
gm169-44	3-48	2-28
gm169-46	4-39	1-39
gm169-57	3-23	1-5
gm169-60	3-43	1-33
gm169-61	4-39	3-20
gm169-64κ	3-7	3-20
gm169-68	4-34	1-5
gm169-70κ	3-13	1-39
gm169-76κ	3-11	2-28
gm169-80κ	4-39	2-28
gm169-86	4-4	1-5
gm169-94	3-30	4-1
gm169-95	1-46	1-39
gp169-8	1-24	3-15
gp169-26κ	3-33	4-1
gp169-29	4-4	3-20
gp169-53κ	4-4	4-1
gp169-64κ	3-30	3-11
gp169-66	4-4	3-20
gp169-81	5-51	2-30
gp169-87	4-39	3-15
gp169-103κ	4-39	4-1
gp169-108	1-2	2-28
gp169-117#	4-59	1-5
gp169-126	3-23	3-15
gp169-127κ	1-69	3-11
gp169-129	5-51	1-12
gp169-144κ	4-4	1-6

gm/gp169	VH	Vλ
gm169-3λ		1-47
gm169-4	3-11	2-23
gm169-8	4-34	1-47
gm169-11	1-2	1-44
gm169-16λ#		2-11
gm169-20λ		3-21
gm169-22λ		3-21
gm169-24λ		9-49
gm169-28λ		2-14
gm169-31λ		3-25
gm169-33#	4-34	2-14
gm169-34λ		1-40
gm169-38λ		3-21
gm169-48	4-4	1-44
gm169-64λ		1-40
gm169-70λ#		1-40
gm169-74	1-46	1-40
gm169-76λ		2-11
gm169-80λ		3-21
gm169-83	3-74	2-11
gm169-85	3-48	1-47
gm169-88	3-30	3-1
gp169-23#	1-58	2-14
gp169-26λ		1-44
gp169-32	4-59	3-21
gp169-43	4-4	1-40
gp169-53λ		2-14
gp169-64λ		6-57
gp169-65	3-30	3-10
gp169-71#	1-18	1-51
gp169-74	3-23	3-1
gp169-77	3-33	6-57
gp169-82#	3-30	1-47
gp169-83	3-23	2-14
gp169-85	3-43	1-36
gp169-86	3-30	3-10
gp169-103λ		6-57
gp169-113	1-69	3-21
gp169-116	3-30	1-40
gp169-122	4-4	2-11
gp169-127λ		1-51
gp169-142	5-51	1-44
gp169-144λ#		2-8
gp169-148#	1-46	6-57

Фиг. 13

Ig	Тяжелая	Легкая
gm174	VH	Vk
174-2	4-39	2-28
174-5	1-69	3-11
174-8	3-11	1-5
174-9	1-2	4-1
174-12#	1-46	1-27
174-17#	3-23	2-29
174-23	5-51	3-11
174-24#	3-30	3-20
174-28	3-23	1-39
174-32	3-49	1-5
174-35	1-46	3-11
174-55#	1-3	3-15
174-60	5-51	1-39
174-67	3-30	1-6
174-79#	3-30	1-39
174-84	4-34	1-39
174-87	3-48	3-20
174-91#	4-31	1-17
174-117#	4-34	1-39
174-119	3-48	3-20
174-120k	1-24	2-30
174-129	3-30	4-1
174-130	4-31	3-11
174-133	1-69	2-28
174-140	4-59	1-39
174-146#	3-72	3-20
174-148#	5-51	1-33
174-154	4-34	1-5
174-156	4-39	1-5
174-157#	3-53	3-15
174-169#	3-23	1-5
174-176	3-23	4-1
174-177	5-51	3-20
174-179#	4-39	1-39
174-184#	4-39	1-5
174-194#	4-31	2-29
174-196	3-7	2-30

gm174	VH	Vl
174-1	1-69	3-10
174-16	4-28	2-23
174-18#	5-51	2-14
174-29	3-15	3-1
174-33	3-21	1-40
174-44	3-33	2-23
174-45	3-53	2-11
174-54	4-59	3-12
174-59	3-33	2-23
174-63	3-74	7-43
174-68	3-7	2-23
174-71	1-46	2-23
174-77	3-15	2-8
174-82	5-51	2-14
174-114	1-18	2-14
174-115#	4-39	2-14
174-118	4-59	1-44
174-120l		2-14
174-125#	7-81	1-40
174-127	3-33	6-57
174-131	4-28	1-51
174-151	3-53	3-1
174-162#	5-51	2-14
174-165	3-53	2-14
174-174	4-39	2-23
174-180	5-51	1-40
174-183#	3-11	1-44

Фиг. 14

Ig	Тяжелая	Легкая
gm175	VH	Vk
175-19	3-23	1-5
175-29	5-51	3-15
175-39#	3-43	3-15
175-62	4-61	1-13
175-77	3-23	1-5
175-79	3-73	2-28
175-86#	3-23	3-15
175-90	4-4	1-5
175-95#	4-34	1-39
175-107	3-7	1-5
175-108	1-69	3-11
175-113#	3-33	1-33
175-116	4-34	4-1
175-128	3-23	2-28
175-140	4-59	1D-43
175-150#	1-18	3-15
175-153	3-7	3-11
175-157	3-23	1-9
175-162	3-33	1-5
175-217	1-8	4-1
175-229#	3-30	3-20
175-233	3-15	2-30
175-240	1-2	1-39
175-241	4-31	1-27
175-250	1-2	3-20
175-258#	3-23	1-16
175-260#	3-30	4-1
175-263#	1-8	3-15
175-264	3-33	3-15
175-265	3-23	3-11
175-266	3-15	3-20
175-269	1-3	3-20
175-276	1-24	2-40
175-277	3-21	1-5
175-285#	3-9	2D-29
175-292#	1-69	3-20

gm175	VH	Vl
175-23	4-39	2-14
175-42	3-74	2-23
175-80	4-34	2-11
175-82#	1-3	1-40
175-101#	4-39	1-47
175-114#	1-3	2-23
175-142#	4-31	2-23
175-146#	4-34	1-51
175-160	3-23	2-11
175-165	3-23	1-44
175-169	1-8	1-47
175-215	4-28	2-23
175-236#	3-49	3-21
175-238	1-2	1-40
175-242	3-11	2-11
175-248#	7-81	3-21
175-249#	3-33	2-23
175-270#	4-34	1-51
175-280	3-48	2-23
175-282	3-74	3-1
175-286	4-61	2-23
175-289	3-11	2-11
175-295	3-9	2-23

Фиг. 15

Ig	Тяжелая	Легкая
gm176	VH	Vk
176-10	3-48	1-33
176-62	3-23	3-15
176-66	4-31	1-5
176-91#	3-21	1-5
176-172#	3-21	3-15
176-214	1-69	3-15
176-236#	4-59	3-15
176-256	1-18	3-15
176-267	3-23	3-15
176-270	4-34	3-15
176-301	3-33	2-28
176-337	3-33	2-28
176-435	1-69	3-15
176-514	1-69	1-39
176-534	3-21	3-15
176-548	3-21	1-27
176-585	4-59	3-20
176-592#	4-31	3-11
176-611	3-9	4-1
176-618	1-58	3-11
176-621	4-34	1-9
176-632	4-59	4-1
176-641	3-23	3-15
176-650k	3-9	4-1
176-655	4-39	3-15
176-694	3-48	1-39

gm176	VH	Vl
176-29	3-48	2-14
176-130#	4-4	1-44
176-223	4-34	1-40
176-226	1-46	1-51
176-229	3-21	1-44
176-241	3-9	2-14
176-253#	4-39	1-40
176-272	4-39	3-9
176-275	1-8	1-51
176-287#	1-2	1-40
176-290#	4-34	2-14
176-310	3-7	1-47
176-318#	5-51	1-40
176-323	1-69	2-14
176-365	4-31	3-21
176-392	4-4	2-14
176-393#	4-61	2-14
176-395	4-59	3-21
176-428#	1-18	2-14
176-447#	4-59	2-14
176-508#	4-4	2-23
176-523	3-30	1-51
176-535	3-11	2-23
176-536	1-2	2-23
176-540	3-30	1-51
176-558	3-48	1-47
176-614	4-39	1-44
176-616	3-9	1-44
176-620	3-9	2-8
176-627	3-30	1-44
176-650l#		4-69
176-662#	3-30	1-51

Фиг. 16

Ig	Тяжелая	Легкая
gmJH	VH	Vκ
JH1	1-18	3-20
JH5	3-30	3-20
JH17	4-34	3-11
JH19#	4-59	3-20
JH20	3-33	3-15
JH22#	1-24	1-39
JH23#	1-18	3-20
JH-26#	5-51	3-20
JH35	3-21	1-6
JH38	3-7	1-39
JH39#	3-30	1-39
JH40#	4-31	3-20
JH55	3-30	3-20
JH56#	1-8	3-20
JH57	4-59	1-39
JH60	3-23	3-20
JH65	1-18	1-39
JH66	3-48	1-39
JH69	3-7	4-1
JH76#	4-31	1-39
JH78#	1-8	3-15
JH81#	7-4	1-39
JH82#	3-48	1-9
JH96	3-30	3-15
JH101#	1-69	3-20
JH103	4-31	2-28
JH113	3-33	1-5
JH114#	1-46	3-20
JH117#	3-23	3-20
JH124#	4-39	1-39
JH125#	3-9	1-12
JH129	1-18	1-33
JH131#	3-7	1-5
JH132	4-39	1-39
JH135	1-18	1-39
JH147#	3-30	3-20
JH148	3-23	1-5
JH154	3-33	3-15
JH156	3-7	1-27
JH160#	3-21	3-20
JH162	3-15	1-33
JH165	3-7	4-1
JH167#	4-59	3-20
JH179	3-23	4-1
JH183#	3-11	3-20
JH186	1-2	1-39
JH188	3-30	1-17
JH192	3-48	3-15
JH194	7-4	1-5
JH195	4-34	3-20

gmJH	VH	Vλ
JH16	4-39	1-47
JH21	3-15	1-44
JH28#	3-74	2-23
JH42	7-4	1-51
JH48#	5-51	1-40
JH50	4-31	2-23
JH59#	1-2	1-44
JH63	4-34	1-47
JH75	4-34	3-21
JH79	4-31	2-14
JH88	3-66	1-44
JH91	3-21	2-8
JH93	4-39	3-1
JH95	4-59	1-47
JH105#	4-4	2-8
JH107#	3-23	2-14
JH109#	5-51	2-14
JH128	4-59	6-57
JH143#	5-51	2-23
JH171	4-39	2-23
JH185#	4-59	2-14

Фиг. 17

S3 preB	
VH	Vk
3-9	1-16
3-30	2D-30
3-48	1-33
4-59	1D-17
3-30	1D-8
1-2	1-5
1-2	1-6
3-15	1D-43
3-30	2-30
3-30	3-11
3-11	1-6
4-59	2-30
3-30	3-20
1-3	2-30
VH	VL
3-21	1-51
3-21	7-46
3-53	1-47
1-2	3-27
1-69	1-44
3-21	2-23

S4 ei	
VH	Vk
3-23	4-1
3-23	1-8
4-34	1-16
3-33	1-39
3-30	3-20
4-34	2D-28
3-74	4-1
VH	VL
3-21	1-47
3-23	1-36
3-48	3-25
4-39	1-44
1-69	3-1
4-59	1-40
4-34	1-44

S5 imm	
VH	Vk
3-48	1-8
3-15	1-9
4-39	1-39
3-7	1-8
3-33	1-5
1-18	1-5
3-15	1-9
3-23	1-8
4-34	1-39
3-30	1-39
3-15	1-39
7-81	1-39
3-15	1-33
3-23	3-15
4-39	3-11
4-34	3-15
3-11	1D-8
1-2	3-20
4-31	3-15
3-21	1-39
3-33	1-9
3-15	1-5
4-39	1-5
1-69	4-1
1-58	4-1
VH	VL
1-46	1-44
3-11	4-69
3-23	3-19
1-18	2-11
4-61	7-43
5-51	2-14
3-15	1-44
3-11	3-1
3-15	3-25
5-51	2-14
1-69	1-51
1-18	2-14
3-23	3-1

Фиг. 18

S6 imm	
VH	Vk
1-18	2-40
4-59	3-20
3-21	1-5
1-2	1-5
1-18	1-33
4-34	1-39
1-8	2D-28
4-34	3-20
4-34	1-39
1-2	1-39
3-30	2-24
3-15	3-20
1-24	2-24
1-3	1-39
3-30	3-20
4-4	1D-8
3-21	3-15
4-39	3-20
4-59	1-27
3-9	1-8
3-7	3-15
3-33	sD-28
1-69	1-39
3-30	1-5
1-18	3-11
3-15	3-20
3-21	1-5
1-2	1-8
3-74	3-15
4-4	4-1
VH	VL
4-34	1-47
5-51	1-40
4-61	2-11
3-30	2-23
3-15	2-23
4-31	1-44
3-13	1-47
4-39	1-44
5-51	2-14
3-33	1-40
3-30	1-51
4-34	1-51
3-21	3-1
3-30	2-14
4-31	3-21

S7 ne	
VH	Vk
3-53	1-39
1-69	1-33
3-21	3-15
5-51	2D-28
3-13	1-5
1-69	1-8
3-30	1-27
4-34	1-27
3-30	1-9
1-69	1-39
3-15	1-5
4-49	3-20
3-21	2D-28
4-39	3-15
3-15	1-39
3-74	3-20
3-30	2D-28
3-30	1-6
3-23	3D-20
3-30	3-11
VH	VL
5-51	1-40
3-7	1-51
3-9	2-14
4-59	1-44
4-49	2-14
1-69	1-40
4-39	1-51
4-31	2-14
3-9	2-14
5-51	1-44
3-49	1-40
4-39	2-14
5-51	1-44

S8 ne	
VH	Vk
3-13	1-39
3-7	3-11
1-46	3-15
3-48	3-11
3-48	3-20
1-46	1-33
3-49	1-5
1-3	1-39
1-18	3-20
4-59	1-5
4-39	3-11
3-23	1-5
4-39	1-33
1-69	3D-15
3-33	1-9
1-3	3-15
1-46	1-8
3-7	1-39
5-51	1-5
3-33	3-15
4-34	1-39
3-53	1D-16
1-18	3-20
1-2	3-20
3-7	1-13
VH	VL
1-18	3-10
1-2	3-1
3-30	3-1
1-3	3-1
3-30	1-51
3-7	1-40
5-51	3-21
1-46	1-44
3-21	2-14
1-2	1-40
4-59	2-11
4-34	2-14
3-48	2-14
1-2	2-14
3-48	1-51
3-48	3-1

Фиг. 19

S9 mn	
VH	Vk
4-39	3-15
3-7	2D-28
4-59	3-20
3-43	1-5
3-53	1-5
3-15	1-5
1-24	1-39
3-48	3-11
4-39	3-15
4-34	3-20
4-34	3-20
3-43	1-5
4-39	3-15
3-15	3-20
1-3	1-39
3-30	1-39
3-48	1-39
3-48	1-9
1-69	2-30
1-18	1-33
3-30	1-9
3-21	3-11
4-34	3-20
3-23	2D-28
1-24	3-11
3-49	3-20
5-51	2D-28
1-46	1-39
4-59	1-39
1-69	1-39
3-15	1-33
4-34	3-15
3-48	1-39
1-69	1-39
4-39	3-15
3-74	1D-37
3-23	1-39
1-46	1-9
3-23	3-15
3-15	1-39
3-48	3-15

VH	VL
1-24	1-44
4-28	1-44
4-34	2-14
3-74	3-21
5-51	3-21
3-23	3-1
3-15	1-44
4-39	2-14
3-48	2-14
1-69	2-14
4-39	1-40
5-51	3-25
3-64	3-21
4-28	1-36
4-59	3-1
1-2	1-40
5-51	1-40
3-7	3-21
1-69	1-51
3-9	2-14
3-9	1-44
3-33	2-14
5-51	1-36
4-34	2-23
3-30	3-21
1-69	1-40
3-43	1-51
3-11	1-47
4-34	2-8
1-8	2-14

S10 mn	
VH	Vk
1-2	4-1
4-34	3-20
1-18	3-20
3-30	1-39
4-39	1-39
4-59	4-1
4-39	3-15
4-39	3-20
1-24	2-30
1-2	3-20
3-9	1-16
4-59	3-20
4-31	2-28
4-59	1-16
4-39	3-20
3-53	1-17
3-48	3-11
3-48	3-20
4-59	3-20
5-51	1-39
3-9	1-5
4-39	3-15
3-30	1-9
4-34	1-39
VH	VL
1-69	2-8
5-51	1-44
3-30	9-49
5-51	1-44
4-39	3-1
1-69	3-25
4-59	2-23
3-48	2-14
3-21	1-51
5-51	1-40
4-31	4-69
1-69	1-40
1-46	1-47
3-9	1-47
1-18	2-14
4-39	2-23
1-2	3-1

Фиг. 20

S1 ne

VH	Vk
3-23	3-20
4-59	1-33
1-18	3-20
3-48	1-33
4-34	3-20
3-23	4-1
4-4	2D-29
3-11	1-5
3-53	1-5
3-9	1-39
3-7	1-27
3-48	4-1
5-51	4-1
3-30	3-20
3-53	3-20
3-30	1-39
3-30	4-1
3-7	1-5
7-81	1-39
3-9	4-1
5-51	3-15
3-23	4-1
1-2	1-39
4-59	3-20
4-34	4-1
3-33	1-8
3-48	1-33
5-51	3-15
3-15	2D-28
1-18	1-39
1-3	1-33
4-59	4-1
4-39	1-33
3-15	3-11
1-18	2-30
4-39	4-1
3-48	3D-20

VH	VL
3.23	2-8
4-39	2-14
3-23	3-21
3-33	3-27
5-51	1-40
7-81	3-21
4-4	1-44
1-2	2-14
4-4	1-44

S2 mn

VH	Vk
3-7	4-1
3-73	1-9
1-18	1-5
3-23	3-15
5-51	4-1
3-23	1-12
3-9	1-39
3-33	4-1
3-53	1-12
4-39	3-20
3-23	3-20
3-72	3-15
3-48	1-33
5-51	3-15
5-51	4-1
5-51	3-20
1-2	3-15
3-21	4-1
3-11	1-39
1-2	3-20
3-48	4-1
4-39	1-5
4-39	1-39
1-2	1-27
4-31	1-39
4-59	1-39
4-39	1-33
4-39	1-6
3-48	4-1
3-23	4-1
3-7	3-15
3-53	4-1
3-7	3-20

VH	VL
4-39	1-44
1-2	1-44
1-69	2-8
4-59	3-1
4-39	2-8
3-23	1-40
4-31	1-51
4-34	1-51
3-49	2-14
4-31	1-47
1-18	1-40
4-31	2-14
4-39	1-51
4-39	2-14
3-48	7-46

Фиг. 21

S3 ne

VH	Vk
3-30	4-1
3-49	1-17
3-23	1-8
3-30	3-15
3-64	3-15
1-18	3-11
3-48	1-5
1-24	1-33
3-30	1-5
1-69	4-1
1-8	3-11
3-9	2D-29
1-18	2-28
3-30	3-15
3-23	4-1
1-8	3-15
4-39	1-5
4-31	1-6
3-23	1-5
3-33	3-20
3-53	1-8
3-53	1-8
3-7	1D-8
4-39	1-39
3-30	1-9
5-51	4-1
3-53	1-5
4-39	1-5
4-34	3-20
1-69	1-5
4-59	3-20
3-7	1-17
3-21	1-8
3-23	1-5
3-30	1-33
3-30	1-5
4-31	3-11
1-2	1-5
4-61	3-15
3-30	1-39
3-48	3-15
3-7	1-8
3-23	1-5

VH	VL
1-18	1-36
3-43	2-14
5-51	1-40
5-51	1-40
4-39	1-51
3-23	2-14
3-43	3-1
4-59	1-40
3-7	2-14
3-7	1-47
1-18	1-40
4-61	3-1
3-30	1-44
4-61	2-14
3-33	2-14
1-18	1-40
4-59	1-40
1-24	2-11
5-51	1-47
4-34	2-14
1-8	9-49

Фиг. 22

S4 mn

VH	Vk
3-30	3-11
4-34	3-11
3-30	1-5
1-58	1-5
3-21	3-15
4-39	2-30
3-23	1-33
3-7	1-9
3-30	3-11
3-23	3-20
4-34	1-5
4-34	1-17
3-53	1-33
3-21	3-20
4-31	1-33
4-34	1-39
1-18	3-20
3-53	1-5
4-61	1-39
3-21	1-39
5-51	1-27
5-51	4-1
3-30	2D-29
3-53	1-5
3-23	1-39
5-51	4-1
3-11	3-20

VH	VL
4-59	1-51
3-23	2-14
3-15	2-8
3-11	3-1
4-28	2-23
4-34	1-44
4-59	3-1
3-30	1-51
3-30	3-27
4-39	2-18
5-51	1-40
5-51	1-47
4-39	2-8
3-33	1-47

S5 ne

VH	Vk
4-34	1-39
3-23	3-15
3-23	3-20
4-61	1-39
3-64	3-11
3-15	3-15
3-53	2-28
1-18	3-11
3-49	1-39
3-64	2D-29
3-21	3-15
4-59	1-33
3-53	3-11
3-23	3-15
3-9	1-27
3-13	2-30
4-4	3-11
3-33	3-20
5-51	2-28
3-7	3-20
3-23	2-40
4-31	1-39
3-23	1-16
3-48	2-28
4-31	1-33
4-31	1-27
3-48	3-20
3-53	4-1
4-4	2D-29
4-31	4-1
4-34	2-28
4-34	3-15
1-69	3-20
3-15	1-27
1-24	3-15
1-2	2D-26

VH	VL
1-3	3-1
1-69	2-11
3-33	3-9
4-31	1-51
4-59	3-1
1-46	1-44
4-4	2-23
4-39	2-8
1-3	2-14
3-15	1-47
3-48	3-21
3-21	2-14
3-11	3-21
3-30	2-14

S6 mn

VH	Vk
3-13	4-1
4-34	4-1
3-15	4-1
1-18	2-28
1-69	1-16
3-23	4-1
3-23	1-5
3-30	3-15
3-48	1-17
3-23	1-33
3-23	1-16
3-53	3-15
3-48	2-28
3-7	1-9
3-30	3-11
3-30	4-1
3-43	3-11
1-18	2-28
3-30	4-1
5-51	3-11
3-23	2-28
1-2	3-15
3-11	3-20
4-31	3-11
1-24	2D-28
1-46	3-20
5-51	1-17
1-58	3-20
4-59	3-20
3-21	1-5
1-8	4-1
3-53	4-1
3-23	1-39
3-64	1-5
4-4	3-15
1-46	4-1

VH	VL
3-64	2-14
3-23	1-40
3-74	2-8
4-34	1-40
5-51	2-14
3-21	1-51
3-11	1-51
1-8	1-47
3-48	1-19
1-69	2-14
3-23	2-11
3-23	1-40

Фиг. 23

S1 mn

VH	Vk
4-4	3-11
1-18	3-20
3-74	2-30
5-51	3-11
3-30	1-5
3-21	3-20
3-23	2D-40
4-39	3-20
4-31	3-20
3-15	3-15
4-39	3-15
4-4	3-20
1-18	1-5
4-39	3-20
4-59	1D-39
3-30	3-20
3-33	1D-39
4-34	1-5
3-21	3-20
1-8	1-9
4-34	3-20
4-4	3-11
1-46	3-20
1-18	1-8
4-39	1-39
4-59	1-8
3-7	3-15
3-53	1D-39

VH	VL
3-33	1-47
3-30	3-21
4-59	1-51
3-15	6-57
4-39	2-14
3-73	1-51
5-51	3-25
3-53	1-51
3-48	3-1
4-39	7-46
4-39	6-57
1-18	1-40
4-34	2-8
5-51	1-40
4-39	2-8
4-39	1-40
4-39	2-8
1-18	2-8

S2 mn

VH	Vk
3-7	3-11
3-23	3-11
4-4	4-1
4-59	1-12
4-39	1-5
1-3	1-5
5-51	4-1
4-34	4-1
4-34	3-20
4-39	3-11
3-33	3-15
3-15	1-39
1-18	4-1
4-34	3-15
4-31	3-15
1-2	1-33
4-39	1-5
4-34	1-39
4-39	1-5
3-74	1-5
4-39	3-20
1-18	3-20
4-34	3-20
4-39	1-5
3-7	1D-17
5-51	2-28
3-53	1-27
1-69	1D-16
4-34	3-11
3-53	1-39
1-69	1-5
4-31	3-20
4-31	1-33
3-15	3-20
3-48	3-20
5-51	1-5
4-59	3-11
3-30	1-39
3-11	1-39
3-33	3-15
4-59	3-11
4-34	3-11
3-30	1-5
4-39	1-27
3-30	3-11
4-34	2-28
3-33	3-20
3-30	3-11
4-34	3-15
4-39	1-39
3-48	1-27
4-34	3-20
4-4	3-20

VH	VL
5-51	2-23
1-46	1-51
3-48	3-1
3-30	1-40
1-46	1-51
3-30	1-40
4-31	1-40
4-59	1-47
4-31	3-1
3-9	2-23
4-34	1-40
3-9	2-14
3-9	2-11
4-39	2-8
1-18	1-51
4-59	1-51
4-31	2-14
4-61	1-44
4-31	1-40
3-9	1-44
3-30	1-51
3-11	9-49
4-4	1-51
1-18	3-25

Фиг. 24

S3 mn

VH	Vk	VH	VL
3-23	3-20	3-15	1-44
1-46	1-16	3-23	2-23
3-30	1-5	4-4	1-44
3-33	1D-33	3-15	3-21
3-7	1D-39	1-2	2-8
1-69	1D-39	3-30	2-11
4-34	3-20	4-31	2-23
3-74	3-11	3-49	2-28
3-15	1D-33	1-18	6-57
1-3	2D-29	3-11	1-44
1-18	1D-33	1-69	2-11
1-46	1-16	4-39	2-23
3-23	1-5	1-2	2-8
4-39	3-20	3-49	3-21
3-30	3-11	4-34	2-8
3-11	2D-28	3-9	2-11
3-7	4-1		
3-23	1-5		
3-15	1-5		
3-72	3-15		
3-11	3-11		
3-21	2D-29		
3-23	1-5		
1-69	3-20		
1-69	1D-39		
1-69	3-20		
3-11	1-16		
3-23	1-27		
4-34	2D-28		
3-53	1-9		
1-69	2D-30		
1-8	2-29		
3-7	3-15		
3-53	1-5		
3-23	1D-33		
3-48	1D-33		
3-15	3-11		
4-31	2D-28		
3-23	1D-39		
3-23	2D-28		
4-61	1-16		
3-30	1D-39		
4-34	3-15		
3-33	4-1		
3-21	1-5		
3-49	3-15		
5-51	3-20		
4-31	1-17		
4-34	1D-39		
1-18	2D-28		
3-53	1D-33		
5-51	3-20		
5-51	3-20		
3-53	2-29		

S4 mn

VH	Vk	VH	VL
1-69	1D-39	3-21	2-11
3-23	3-15	1-69	2-8
4-4	3-20	4-34	2-14
3-21	1-27	1-24	2-23
3-23	1-17	3-23	1-40
1-18	1D-39	4-34	1-40
3-23	3-20	3-48	1-44
4-4	1D-39	3-48	1-47
1-46	1D-39	3-73	1-47
3-7	1D-39	4-4	2-14
4-34	3-20	3-23	1-40
3-30	1-16		
1-69	2D-28		
1-69	3-20		
3-53	1D-33		
1-69	1D-39		
4-31	3-11		
3-21	1D-39		
4-39	1-27		
1-18	3-20		
1-24	3-20		
3-23	3-20		
3-23	1-27		
3-30	3-15		
1-2	2D-28		
4-61	3-15		
3-15	1D-39		
3-7	1D-39		
1-18	1D-39		
3-23	3-11		
1-18	1D-39		
3-23	2D-28		
1-2	1-27		
3-53	3-15		
4-34	1-17		
3-15	1D-39		
3-53	1D-39		
3-30	2D-28		
3-11	1D-39		
3-23	3-20		
3-23	3-15		

Фиг. 25

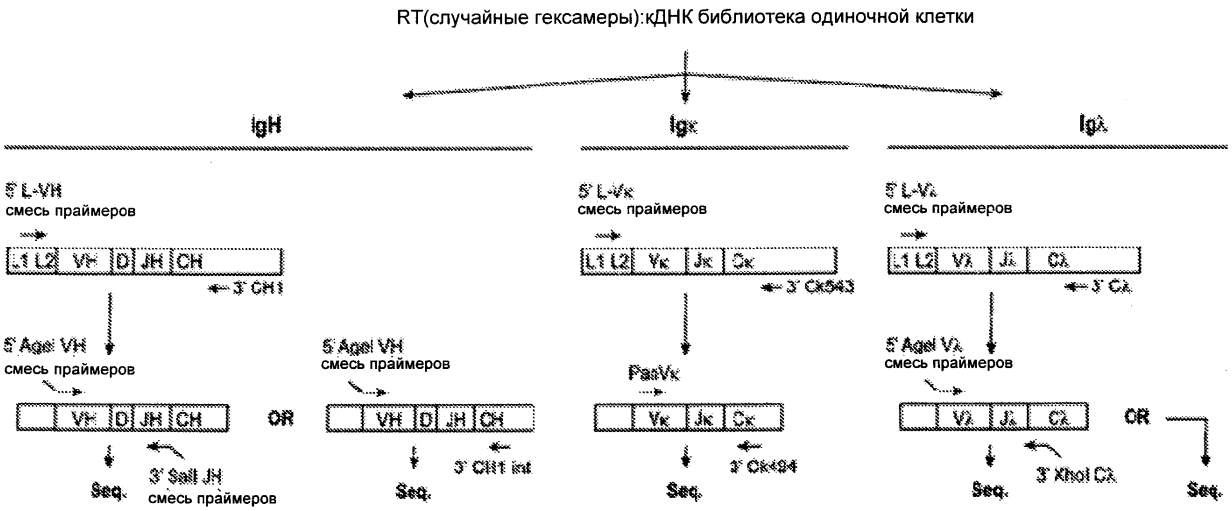
S5 mn

VH	Vk	VH	VL
4-39	1D-39	1-69	2-14
4-34	3-20	3-15	3-22
3-21	3-15	5-51	1-40
3-48	3-20	4-34	1-51
3-15	3-20	3-23	1-51
4-59	1-39	1-2	2-11
4-4	3-20	4-59	1-51
4-39	1-17	3-49	2-8
3-49	1-39	1-18	1-44
4-4	1-5	1-69	1-40
4-34	4-1	3-66	1-47
4-34	1-9	3-48	2-11
3-15	3-11	4-31	2-14
4-34	1-39	4-28	2-14
3-48	3-11	1-2	2-14
3-30	3-20	3-73	1-40
3-20	1-39	3-48	1-47
3-48	1-16	4-34	2-14
3-30	1-39	3-23	2-23
1-69	3-20	1-24	2-23
4-39	3-15		
4-31	2-40		
3-33	3-20		
4-59	4-1		
4-34	1-39		
4-59	3-11		
3-11	3-15		
1-18	1-5		
3-7	1-39		
4-34	4-1		

S6 mn

VH	Vk	VH	VL
1-18	3-20	1-8	2-8
4-59	1D-39	4-34	1-51
3-53	3-11	3-11	8-61
4-4	1-5	1-18	6-57
3-53	1D-33	4-34	2-14
3-9	1D-39	4-34	1-47
5-51	1D-39	1-2	2-14
3-11	1-9	3-21	4-69
3-7	3-11	3-74	1-47
1-18	4-1		
3-48	1-6		
4-59	1D-39		
3-53	4-1		
3-30	4-1		
4-59	4-1		
3-30	1-5		
4-59	1D-39		
3-7	2-30		
4-59	1D-39		
3-53	3-15		
3-23	1-27		
4-34	1D-39		
1-2	1D-39		
3-23	2-29		
3-13	1D-33		
4-59	3-20		
3-21	4-1		
3-7	3-20		
3-21	3-15		
1-8	1D-39		
3-66	1D-39		
3-23	3-20		
3-21	1-8		
3-13	1D-39		
3-23	1-27		
3-23	1-17		
3-21	1D-39		
1-18	2-28		
4-34	1-5		
4-54	3-11		
3-49	1D-39		
4-39	1D-39		
3-48	2D-29		
3-21	1D-39		
3-64	1-9		
3-23	3-20		
3-53	3-20		
4-34	3-20		
3-23	1-17		
4-4	1-27		
4-34	1D-33		
3-48	1-8		
1-24	4-1		
4-4	2-28		

Фиг. 26


RT(случайные гексамеры):кДНК библиотека одиночной клетки
IgH
Igκ
Igλ
5' L-VH
смесь праймеров
L1 L2 VH D JH CH
3' CH1
5' AgeI VH
смесь праймеров
VH D JH CH
OR
Seq.
3' SalI JH
смесь праймеров
5' AgeI VH
смесь праймеров
VH D JH CH
Seq.
3' CH1 int
5' L-Vκ
смесь праймеров
L1 L2 Vκ Jκ Cκ
3' Cκ543
PacVκ
Vκ Jκ Cκ
Seq.
3' Cκ494
5' L-Vλ
смесь праймеров
L1 L2 Vλ Jλ Cλ
3' Cλ
5' AgeI Vλ
смесь праймеров
Vλ Jλ Cλ
OR
Seq.
3' XhoI Cλ
Seq.

Фиг. 27

	VH	Vk	Vl
ascTT_201	1-02*02		1-44*01
ascTT_65	1-02*02		1-51*01
ascTT_153	1-02*02		2-14*04
ascTT_316	1-02*02		7-46*01
ascTT_294	1-02*04		2-14*03
ascTT_307	1-08*01	1-05*03	
ascTT_350	1-18*01	1-17*01	
ascTT_06	1-18*01	3-20*01	
ascTT_207	1-18*01		1-51*01
ascTT_164	1-58*01	3-20*01	
ascTT_395	1-69*01	3-15*01	
ascTT_138	1-69*01	3-20*01	
ascTT_214	1-69*01	4-01*01	
ascTT_51	1-69*01		1-44*01
ascTT_176	1-69*01		1-44*01
ascTT_212	1-69*01		1-44*01
ascTT_258	1-69*01		1-44*01
ascTT_327	1-69*01		1-44*01
ascTT_08	1-69*01		2-11*01
ascTT_310	1-69*06	1-27*01	
ascTT_255	1-69*06	1-39*01	
ascTT_178	1-69*06	3-11*01	
ascTT_79	1-69*06	3-15*01	
ascTT_334	1-69*06	3-15*01	
ascTT_105	1-69*06	3D-15*01	
ascTT_61	1-69*06	4-01*01	
ascTT_231	1-69*06	4-01*01	
ascTT_265	1-69*06		1-47*01
ascTT_179	1-69*06		6-57*01
ascTT_101	3-07*01	1-05*03	
ascTT_42	3-07*01		1-44*01
ascTT_195	3-07*01		1-44*01
ascTT_390	3-09*01		1-51*01
ascTT_182	3-09*01		
ascTT_188	3-09*01		
ascTT_225	3-09*01		
ascTT_319	3-11*01	1-12*01	
ascTT_29	3-11*01		1-40*01
ascTT_385	3-11*01		7-46*01
ascTT_87	3-11*03	1-39*01	
ascTT_349	3-20*01		2-14*03
ascTT_156	3-21*01		1-51*01
ascTT_344	3-21*01		3-21*01

Фиг. 28

	VH	Vk	Vl
ascTT_31	3-23*01	1-05*03	
ascTT_45	3-23*01	1-05*03	
ascTT_59	3-23*01	1-05*03	
ascTT_78	3-23*01	1-05*03	
ascTT_88	3-23*01	1-05*03	
ascTT_148	3-23*01	1-05*03	
ascTT_292	3-23*01	1-05*03	
ascTT_320	3-23*01	1-05*03	
ascTT_348	3-23*01	1-05*03	
ascTT_358	3-23*01	1-39*01	
ascTT_365	3-23*01	1-39*01	
ascTT_158	3-23*01	3-20*01	
ascTT_204	3-23*01		1-44*01
ascTT_245	3-23*01		1-44*01
ascTT_275	3-23*01		1-44*01
ascTT_56	3-23*01		2-14*04
ascTT_278	3-23*01		2-23*01
ascTT_21	3-30*18	1-09*01	
ascTT_335	3-30*18	3-11*01	
ascTT_159	3-30*18	3-15*01	
ascTT_274	3-30*18	3-15*01	
ascTT_109	3-30*18		1-40*01
ascTT_27	3-30*18		2-14*01
ascTT_394	3-30*18		3-21*03
ascTT_193	3-33*01	3-15*01	
ascTT_144	3-33*05		4-69*02
ascTT_162	3-43*01		2-11*01
ascTT_124	3-43*01		9-49*01
ascTT_57	3-48*01	3-20*01	
ascTT_77	3-48*01	3-20*01	
ascTT_01	3-53*01		1-44*01
ascTT_28	3-53*01		1-44*01
ascTT_36	3-53*01		1-44*01
ascTT_141	3-53*01		1-44*01
ascTT_229	3-53*01		1-44*01
ascTT_304	3-53*01		1-44*01
ascTT_341	3-53*01		1-44*01
ascTT_354	3-53*01		1-44*01
ascTT_134	3-64*05		3-21*01
ascTT_03	3-74*01		2-23*01
ascTT_259	4-30-2*01	4-01*01	
ascTT_328	4-31*03	3-20*01	
ascTT_306	4-31*03		1-51*01

Фиг. 29

	VH	Vk	Vl
ascTT_25	4-31*03		2-08*01
ascTT_85	4-31*03		2-08*01
ascTT_96	4-31*03		2-08*01
ascTT_185	4-31*03		2-08*01
ascTT_187	4-31*03		2-08*01
ascTT_312	4-31*03		2-08*01
ascTT_311	4-31*03		2-08*01
ascTT_313	4-31*03		2-08*01
ascTT_116	4-31*03		2-08*01
ascTT_196	4-39*01	1-06*01	
ascTT_47	4-39*01	2-28*01	
ascTT_295	4-39*01		1-40*01
ascTT_318	4-39*01		1-44*01
ascTT_337	4-39*01		1-44*01
ascTT_35	4-39*01		3-21*03
ascTT_40	4-39*01		3-21*03
ascTT_81	4-39*01		3-21*03
ascTT_93	4-39*01		3-21*03
ascTT_126	4-39*01		3-21*03
ascTT_166	4-39*01		3-21*03
ascTT_210	4-39*01		3-21*03
ascTT_224	4-39*01		3-21*03
ascTT_244	4-39*01		3-21*03
ascTT_370	4-39*01		3-21*03
ascTT_392	4-39*01		3-21*03
ascTT_232	4-39*01		3-21*03
ascTT_263	4-59*01		2-08*01
ascTT_15	4-59*01	1-39*01	
ascTT_122	4-59*01	3-15*01	
ascTT_276	4-59*01	3-15*01	
ascTT_302	4-59*01	3-15*01	
ascTT_110	4-59*03	1-39*01	
ascTT_34	4-59*04	1-39*01	
ascTT_173	4-61*01		2-14*03
ascTT_177	5-51*01	1-13*02	
ascTT_190	5-51*01	1-13*02	
ascTT_233	5-51*01	1-13*02	
ascTT_84	5-51*01	1-13*02	
ascTT_43	5-51*01	1-13*02	
ascTT_147	5-51*01	1-13*02	
ascTT_377	5-51*01	3-11*01	
ascTT_82	5-51*01	3-15*01	

Фиг. 30

	VH	Vk	Vl
mnTT_16	1-02*02	2-30*01	
mnTT_125	1-02*02	3-20*01	
mnTT_436	1-02*02	3-20*01	
mnTT_507	1-02*02	3-20*01	
mnTT_238	1-02*02		1-44*01
mnTT_260	1-02*02		1-51*01
mnTT_451	1-02*02		1-51*01
mnTT_284	1-02*02		2-14*03
mnTT_20	1-02*02		2-23*01
mnTT_278	1-02*02		2-23*01
mnTT_166	1-02*02		3-21*02
mnTT_170	1-02*02		7-46*01
mnTT_548	1-02*03	4-01*01	
mnTT_70	1-02*03		3-01*01
mnTT_75	1-18*01	1-05*03	
mnTT_149	1-18*01	1-12*02	
mnTT_17	1-18*01	1-13*02	
mnTT_06	1-18*01	1-16*02	
mnTT_492	1-18*01	1-33*01	1-44*01
mnTT_490	1-18*01	1-33*01	
mnTT_321	1-18*01	1-39*01	
mnTT_542	1-18*01	2-30*01	
mnTT_318	1-18*01	3-15*01	
mnTT_101	1-18*01	3-20*01	
mnTT_29	1-18*01		1-40*01
mnTT_309	1-24*01	2-28*01	
mnTT_220	1-24*01	3-11*01	
mnTT_311	1-24*01	3-15*01	
mnTT_145	1-24*01		1-40*01
mnTT_217	1-24*01		3-21*02
mnTT_119	1-46*01	1-05*03	
mnTT_76	1-46*01	1-09*01	
mnTT_230	1-46*01	1-39*01	
mnTT_365	1-46*01	3-15*01	
mnTT_328	1-46*01	3-20*01	
mnTT_526	1-46*01	3-20*01	
mnTT_457	1-46*01		2-11*01
mnTT_57	1-46*01		2-14*03
mnTT_88	1-46*01		3-21*02
mnTT_530	1-69*01	1-05*03	
mnTT_263	1-69*01	1-33*01	
mnTT_317	1-69*01	1-33*01	
mnTT_61	1-69*01	1-39*01	
mnTT_331	1-69*01	1-39*01	
mnTT_395	1-69*01	1-39*01	
mnTT_487	1-69*01	2D-29*01	
mnTT_18	1-69*01	3-11*01	
mnTT_234	1-69*01	3-15*01	2-23*01

Фиг. 31

	VH	Vk	Vl
mnTT_379	1-69*01	3-15*01	
mnTT_27	1-69*01	3-20*01	
mnTT_90	1-69*01	3-20*01	
mnTT_209	1-69*01	3-20*01	
mnTT_351	1-69*01	3-20*01	
mnTT_432	1-69*01	4-01*01	
mnTT_545	1-69*01	4-01*01	
mnTT_95	1-69*01		1-40*01
mnTT_279	1-69*01		1-40*01
mnTT_332	1-69*01		1-40*02
mnTT_147	1-69*01		1-44*01
mnTT_183	1-69*01		1-51*01
mnTT_01	1-69*01		2-14*03
mnTT_292	1-69*01		2-14*03
mnTT_244	1-69*01		2-14*04
mnTT_71	1-69*01		2-23*01
mnTT_525	1-69*01		2-23*01
mnTT_250	1-69*01		3-01*01
mnTT_136	1-69*01		1-51*01
mnTT_342	1-69*06	1-05*03	
mnTT_163	1-69*06	1-08*01	
mnTT_48	1-69*06	3-11*01	
mnTT_255	1-69*06	4-01*01	
mnTT_196	1-69*06		1-47*01
mnTT_226	1-69*06		3-21*02
mnTT_168	3-07*01	1-17*01	
mnTT_281	3-07*01	1-39*01	
mnTT_381	3-07*01	1-39*01	
mnTT_518	3-07*01	1-39*01	
mnTT_327	3-07*01		1-44*01
mnTT_64	3-07*02	1-05*03	
mnTT_434	3-07*02	1-13*02	
mnTT_303	3-09*01	1-37*01	
mnTT_419	3-09*01		1-47*01
mnTT_144	3-09*01		2-23*01
mnTT_13	3-09*01		2-23*03
mnTT_39	3-09*01		2-23*03
mnTT_37	3-09*01		3-21*02
mnTT_405	3-09*01		3-21*03
mnTT_131	3-09*01	3-11*01	
mnTT_121	3-11*01	1-05*03	
mnTT_473	3-11*01	1-05*03	
mnTT_385	3-11*01	1-17*01	
mnTT_256	3-11*01	1-33*01	
mnTT_382	3-11*01	3-20*01	
mnTT_66	3-11*01	4-01*01	
mnTT_111	3-11*01		3-25*01
mnTT_127	3-11*01	2-28*01	
mnTT_49	3-11*03	1-39*01	

Фиг. 32

	VH	Vk	Vl
mnTT_537	3-11*03	3-11*01	
mnTT_246	3-11*03	3-15*01	
mnTT_481	3-11*03	4-01*01	
mnTT_272	3-11*03		3-21*01
mnTT_368	3-13*01	4-01*01	
mnTT_252	3-15*01	1-05*03	
mnTT_290	3-15*01	1-05*03	
mnTT_259	3-15*01	2-28*01	
mnTT_228	3-15*01	2D-29*01	
mnTT_326	3-15*01	4-01*01	
mnTT_192	3-15*01		1-51*01
mnTT_59	3-15*01		2-14*04
mnTT_12	3-15*01		7-46*01
mnTT_63	3-15*01		7-46*01
mnTT_233	3-21*01	1-05*03	
mnTT_221	3-21*01	1-39*01	
mnTT_41	3-21*01	3-20*01	
mnTT_56	3-21*01	4-01*01	
mnTT_383	3-21*01	4-01*01	
mnTT_148	3-21*01		1-47*01
mnTT_182	3-21*01		1-51*01
mnTT_215	3-21*01		1-51*01
mnTT_369	3-21*01		1-51*01
mnTT_443	3-21*01		2-11*01
mnTT_350	3-21*01		3-25*01
mnTT_335	3-23*01	1-05*03	
mnTT_15	3-23*01	1-17*01	
mnTT_78	3-23*01	1-33*01	3-21*02
mnTT_418	3-23*01	1-33*01	
mnTT_520	3-23*01	1-33*01	
mnTT_107	3-23*01	1-39*01	
mnTT_466	3-23*01	1-39*01	
mnTT_485	3-23*01	1-39*01	
mnTT_488	3-23*01	1-39*01	
mnTT_34	3-23*01	1D-12*01	
mnTT_158	3-23*01	2-30*01	
mnTT_176	3-23*01	2D-29*01	
mnTT_315	3-23*01	2D-29*01	
mnTT_116	3-23*01	3-11*01	2-23*01
mnTT_87	3-23*01	3-11*01	
mnTT_512	3-23*01	3-15*01	
mnTT_393	3-23*01	3-20*01	
mnTT_539	3-23*01	4-01*01	
mnTT_480	3-23*01		1-47*01
mnTT_322	3-23*01		2-11*01
mnTT_329	3-23*01		2-11*01
mnTT_162	3-23*01		2-14*03
mnTT_258	3-23*01		2-14*03
mnTT_216	3-23*01		2-14*04

Фиг. 33

	VH	Vk	Vl
mnTT_108	3-23*01		3-01*01
mnTT_179	3-23*01		3-21*02
mnTT_195	3-23*01		3-21*02
mnTT_423	3-30*18	1-33*01	
mnTT_468	3-30*18	1D-8*01	
mnTT_153	3-30*18	2-28*01	
mnTT_286	3-30*18	3-11*01	
mnTT_242	3-30*18	4-01*01	
mnTT_185	3-30*18		1-44*01
mnTT_547	3-30*18		1-51*01
mnTT_251	3-30*18		2-14*03
mnTT_126	3-30*18		2-14*04
mnTT_415	3-30*18		2-14*04
mnTT_440	3-30*18		2-14*04
mnTT_72	3-30*18		2-23*01
mnTT_267	3-33*01	1-39*01	
mnTT_123	3-33*01	3-20*01	
mnTT_493	3-33*01	4-01*01	
mnTT_516	3-33*01		1-47*01
mnTT_184	3-33*01		2-14*03
mnTT_44	3-33*01		3-21*01
mnTT_156	3-33*01		3-21*01
mnTT_10	3-33*01		9-49*01
mnTT_140	3-33*01	1-39*01	
mnTT_138	3-33*01		3-01*01
mnTT_81	3-33*01		3-21*01
mnTT_506	3-43*01	4-01*01	
mnTT_08	3-48*01	1-08*01	
mnTT_522	3-48*01	1-39*01	
mnTT_106	3-48*01	4-01*01	
mnTT_91	3-48*01		1-40*01
mnTT_79	3-48*02	1-17*01	
mnTT_194	3-48*02	1-39*01	
mnTT_130	3-48*02	3-15*01	
mnTT_282	3-48*02		9-49*01
mnTT_426	3-49*03	3-11*01	
mnTT_474	3-49*05	1-17*01	
mnTT_270	3-49*05	2-28*01	
mnTT_453	3-53*01	1-33*01	
mnTT_305	3-53*01	3-15*01	
mnTT_137	3-53*01		2-08*01
mnTT_65	3-53*01		2-23*01
mnTT_358	3-64*05	1-05*03	
mnTT_53	3-64*05	3-11*01	
mnTT_447	3-72*01	1-05*03	
mnTT_283	3-72*01		4-69*01
mnTT_82	3-73*01		2-11*01
mnTT_177	3-74*01	1-05*03	
mnTT_09	3-74*01	4-01*01	

Фиг. 34

	VH	Vk	Vl
mnTT_143	3-74*01		2-14*04
mnTT_276	4-04*07	1-17*01	
mnTT_102	4-04*07	3-15*01	
mnTT_191	4-04*07		1-44*01
mnTT_467	4-04*07		1-51*01
mnTT_374	4-04*07		3-25*01
mnTT_132	4-04*07	1-39*01	
mnTT_104	4-30-2*01	1-39*01	
mnTT_408	4-30-2*01		3-21*01
mnTT_319	4-31*01	1-05*03	
mnTT_323	4-31*01	3-15*01	
mnTT_50	4-31*02	1-39*01	
mnTT_188	4-31*02	3-11*01	
mnTT_14	4-31*02		2-14*03
mnTT_77	4-31*02		2-23*01
mnTT_257	4-31*03		1-40*01
mnTT_533	4-31*03		1-47*01
mnTT_546	4-34*01	1-05*03	
mnTT_02	4-34*01	1-08*01	
mnTT_266	4-34*01	1-12*01	
mnTT_380	4-34*01	1-16*01	
mnTT_157	4-34*01	1-33*01	
mnTT_146	4-34*01	1-39*01	
mnTT_384	4-34*01	3-11*01	
mnTT_73	4-34*01	3-20*01	
mnTT_376	4-34*01	3-20*01	
mnTT_236	4-34*01	4-01*01	
mnTT_89	4-34*01		1-36*01
mnTT_68	4-34*01		1-40*02
mnTT_69	4-34*01		1-47*01
mnTT_367	4-34*01		1-47*01
mnTT_32	4-34*01		1-51*01
mnTT_225	4-34*01		1-51*01
mnTT_511	4-34*01		1-51*01
mnTT_441	4-34*01		2-08*01
mnTT_294	4-34*01		2-14*03
mnTT_219	4-34*01		3-21*01
mnTT_165	4-34*01		3-25*01
mnTT_241	4-34*01		7-43*01
mnTT_523	4-34*01		9-49*01
mnTT_273	4-39*01	1-05*03	
mnTT_333	4-39*01	1-05*03	
mnTT_262	4-39*01	1-06*01	
mnTT_459	4-39*01	1-27*01	1-40*01
mnTT_361	4-39*01	1-33*01	
mnTT_84	4-39*01	1-39*01	
mnTT_312	4-39*01	1-39*01	
mnTT_141	4-39*01	2-28*01	
mnTT_455	4-39*01	2-28*01	

Фиг. 35

	VH	Vk	Vl
mnTT_458	4-39*01	2-30*01	
mnTT_360	4-39*01	3-11*01	
mnTT_544	4-39*01	3-11*01	
mnTT_103	4-39*01	3-15*01	
mnTT_110	4-39*01	3-15*01	
mnTT_513	4-39*01	3-15*01	
mnTT_316	4-39*01	3-20*01	
mnTT_271	4-39*01	4-01*01	
mnTT_448	4-39*01	4-01*01	
mnTT_83	4-39*01		1-44*01
mnTT_05	4-39*01		1-51*01
mnTT_74	4-39*01		2-08*01
mnTT_254	4-39*01		2-08*01
mnTT_462	4-39*01		2-18*02
mnTT_171	4-39*01		3-01*01
mnTT_135	4-39*01		2-08*01
mnTT_340	4-59*01	1-05*03	
mnTT_477	4-59*01	1-17*01	
mnTT_28	4-59*01	1-39*01	
mnTT_47	4-59*01	1-39*01	
mnTT_353	4-59*01	3-11*01	
mnTT_269	4-59*01	3-15*01	
mnTT_338	4-59*01	4-01*01	
mnTT_357	4-59*01	4-01*01	
mnTT_118	4-59*01		1-40*01
mnTT_231	4-59*01		1-40*01
mnTT_337	4-59*01		1-40*02
mnTT_427	4-59*01		2-11*01
mnTT_519	4-59*01		2-23*01
mnTT_339	4-59*01		3-01*01
mnTT_442	4-59*01	1-39*01	
mnTT_207	4-61*01	1-12*01	
mnTT_218	4-61*01	1-39*01	
mnTT_159	4-61*01	2-28*01	
mnTT_211	4-61*01		1-44*01
mnTT_253	4-61*01		1-44*01
mnTT_521	4-61*01		1-44*01
mnTT_428	4-61*01		3-21*01
mnTT_151	4-61*07		2-11*01
mnTT_352	4-61*08	4-01*01	
mnTT_407	4-61*08	4-01*01	
mnTT_169	5-51*01	1-33*01	
mnTT_62	5-51*01	3-11*01	
mnTT_430	5-51*01	3-11*01	
mnTT_295	5-51*01	3-15*01	
mnTT_424	5-51*01	3-20*01	
mnTT_444	5-51*01	3-20*01	
mnTT_464	5-a*01	1D-33*01	
mnTT_26	5-a*01		2-14*03
mnTT_210	5-a*01		2-23*03

Фиг. 36

Краткий обзор 20 генов VH-области

		Длины CDR									Epibase контроль		Aggresolve
	Гены тяжелых цепей эмбр. типа	Кабат CDR-H1	Кабат CDR2-H2	VNTI pI	Ранж. положений	PTMs (w/o NxS/T)	NxS/T	Мет. в CDRs	Цистеин (подлеж. удалению)		Отклонения от эмбр. типа	Сильный Т-клеточный эпитоп	Теорет. склонность к агрегации
1	hVH_1_2	5	17	9.4	14	2	0	1	0		0	0	средняя
2	hVH_1_18	5	17	9.2	9	2	0	0	0		0	0	высокая
3	hVH_1_69	5	17	9.3	7	0	0	0	0		0	0	средняя
4	hVH_1_46	5	17	9.2	21	0	0	1	0		0	0	н/о
5	hVH_3_7	5	17	8.5	3	4	0	1	0		0	0	низкая
6	hVH_3_11	5	17	9.0	17	2	0	1	0		0	0	н/о
7	hVH_3_15	5	19	9.0	12	3	0	1	0		0	0	низкая
8	hVH_3_21	5	17	9.0	11	3	0	1	0		0	0	средняя
9	hVH_3_23	5	17	8.7	1	3	0	1	0		0	0	средняя
10	hVH_3_30	5	17	9.3	2	4	0	1	0		0	0	средняя
11	hVH_3_33	5	17	9.3	15	4	0	1	0		0	0	н/о
12	hVH_3_48	5	17	8.0	10	3	0	1	0		0	0	средняя
13	hVH_3_53	5	16	8.7	16	3	0	1	0		0	0	средняя
14	hVH_3_73	5	19	9.3	33	3	0	1	0		0	0	н/о
15	hVH_3_74	5	17	9.1	19	4	0	1	0		0	0	н/о
16	hVH_4_4	6	16	9.3	20	0	0	0	1		0	0	н/о
17	hVH_4_31	7	16	9.2	13	0	0	0	0		0	0	н/о
18	hVH_4_39	7	16	9.0	3	0	0	0	0		0	0	н/о
19	hVH_5_51	5	17	8.6	6	1	0	0	0		0	0	средняя
20	hVH_6_1	7	18	9.3	39	3	0	1	0		0	0	н/о

Фиг. 37

Краткий обзор 20 генов VL-области

	Гены легких цепей эмбр. типа	Кабат CDR-L1	Кабат CDR-L2	VNTI pI	Ранж. положений	PTMs (w/o NxS/T)	NxS/T	Мет в CDRs	Цистеин (подлеж. удалению)		Отклонения от эмбр. типа	Сильный Т-клеточный эпитоп	Теорет. склонность к агрегации
1	hVL_1-40	14	7	4.9	2	1	0	0	0		0	0	средняя
2	hVL_1-47	13	7	5.0	5	0	0	0	0		0	0	средняя
3	hVL_1-51	13	7	6.2	4	0	0	0	0		1	0	средняя
4	hVL_2-11	14	7	6.7	8	0	0	0	0		0	0	н/о
5	hVL_2-23	14	7	6.7	6	0	0	0	0		0	0	н/о
6	hVL_2-14	14	7	5.6	1	0	0	0	0		0	0	высокая
7	hVL_3-1	11	7	4.5	3	2	0	0	1		2	1*	н/о
8	hVL_3-21	11	7	4.8	7	2	0	0	0		1	1*	н/о
9	hVK_1_5	11	7	5.0	3	1	0	0	0		0	0	высокая
10	hVK_1_6	11	7	8.0	16	0	0	0	0		0	0	н/о
11	hVK_1_9	11	7	8.0	9	0	0	0	0		0	0	н/о
12	hVK_1_12	11	7	8.0	15	0	0	0	0		0	0	н/о
13	hVK_1_16	11	7	8.0	14	0	0	0	0		0	0	н/о
14	hVK_1_17	11	7	8.7	11	0	0	0	0		0	0	н/о
15	hVK_1_27	11	7	8.7	12	0	0	0	0		0	0	н/о
16	hVK_1_39	11	7	8.0	2	0	0	0	0		0	0	высокая
17	hVK_2_30	16	7	8.0	10	2	0	0	0		0	0	н/о
18	hVK_3_11	11	7	6.3	5	0	0	0	0		0	0	средняя
19	hVK_3_15	11	7	8.0	4	0	0	0	0		0	0	средняя
20	hVK_3_20	12	7	6.3	1	0	0	0	0		0	0	низкая
alt.	hVK_1_8	11	7	8.9	12	0	0	0	1		н/о	н/о	н/о

Фиг. 38

1358.0	IGKV3-20	IGKV1-39/1D-39	IGKV1-5	IGKV3-15	IGKV4-1	IGKV3-11	IGKV2-28/2D-28	IGKV1-33/1D-33	IGKV1-9	IGKV2-30	IGKV1-17	IGKV1-27	IGKV1-8	IGKV1-16	IGKV1-12	IGKV1-6	IGKV2D-29	IGKV1-13	IGKV2-24	IGKV1D-8	IGKV2-29	IGKV5-2	IGKV3D-20	IGKV1D-12	IGKV2-40/2D-40	IGKV1D-43	IGKV2D-30	IGKV1D-16	IGKV3D-15	IGKV1D-13	IGKV1D-17
>VH3-23	24	12	27	20	13	8	7	6	3	1	5	4	4	3	1	0	2	0	0	0	2	0	1	1	2	0	0	0	0	1	0
>VH3-30	14	12	8	9	11	12	4	2	7	2	1	1	2	1	0	2	1	1	2	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
>VH4-39	13	16	14	22	5	6	5	4	0	2	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
>VH4-59	15	19	3	3	10	4	0	2	0	1	1	3	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
>VH4-34	25	16	8	6	7	6	6	3	2	0	2	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	10	7	4	7	5	5	4	3	1	2	1	1	0	0	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	12	14	6	7	8	8	3	3	0	1	0	2	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0
>VH3-7	5	10	10	6	5	4	3	0	2	4	2	2	3	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH1-18	15	6	5	4	2	4	5	7	0	3	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-48	12	8	1	5	8	7	3	6	2	0	2	1	3	2	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	5	7	8	8	4	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	10	6	6	4	4	3	3	4	3	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH4-31	7	4	4	4	2	7	4	3	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	12	6	3	2	3	0	2	1	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	6	6	5	6	6	2	4	2	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-53	2	5	6	6	4	4	1	5	1	0	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
>VH3-11	3	5	6	5	2	5	3	1	1	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-9	1	3	2	2	3	2	1	0	0	0	1	1	1	2	1	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-74	4	3	3	3	3	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	6	5	4	3	3	3	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	6	5	3	3	1	2	0	1	4	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	0	3	0	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	2	1	1	4	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	1	3	0	3	1	4	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH1-3	2	4	1	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	2	4	2	1	0	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	0	0	3	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	0	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	3	1	0	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	1	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-4.1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH2-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH6-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Фиг. 39

779.0	IGLV 2-14	IGLV 1-40	IGLV 1-44	IGLV 1-51	IGLV 1-47	IGLV 2-23	IGLV 3-21	IGLV 2-11	IGLV 3-1	IGLV 2-8	IGLV 6-57	IGLV 1-36	IGLV 3-25	IGLV 4-69	IGLV 7-43	IGLV 7-46	IGLV 2-18	IGLV 3-27	IGLV 9-49	IGLV 3-10	IGLV 3-9	IGLV 8-61	IGLV 3-12	IGLV 3-19	IGLV 3-22	IGLV 4-60
>VH3-23	13	6	5	3	1	4	6	5	5	1	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
>VH3-30	7	5	4	9	1	2	3	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0
>VH4-39	10	6	7	5	3	5	13	0	2	10	2	0	0	0	0	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH4-59	4	8	4	4	3	2	2	2	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
>VH4-34	10	6	2	9	6	2	2	1	0	4	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	11	14	6	0	4	3	3	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	6	7	8	5	2	3	2	5	2	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-7	2	4	3	3	3	1	3	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-18	5	5	3	3	0	1	0	1	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-48	6	1	1	1	6	1	1	2	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	5	2	2	9	3	1	2	2	1	1	1	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	1	2	4	2	1	1	1	0	2	2	1	0	1	0	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
>VH4-31	3	3	1	3	3	4	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	3	6	5	3	0	3	1	1	3	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	4	1	1	1	4	4	4	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
>VH3-53	2	0	9	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-11	3	1	3	1	1	2	2	3	3	1	0	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
>VH3-9	6	1	4	1	3	7	2	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH3-74	2	0	0	0	1	3	3	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	4	3	6	2	0	2	0	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	3	1	3	4	1	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	3	0	4	0	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	4	0	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	1	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-3	2	1	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	1	1	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	1	0	2	2	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	1	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-4.1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH2-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH6-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Фиг. 40

888.0	IGKV3-20	IGKV1-39/1D-39	IGKV1-5	IGKV3-15	IGKV4-1	IGKV3-11	IGKV2-28/2D-28	IGKV1-33/1D-33	IGKV1-9	IGKV2-30	IGKV1-17	IGKV1-27	IGKV1-8	IGKV1-16	IGKV1-12	IGKV1-6	IGKV2D-29	IGKV1-13	IGKV2-24	IGKV1D-8	IGKV2-29	IGKV5-2	IGKV3D-20	IGKV1D-12	IGKV2-40/2D-40	IGKV1D-43	IGKV2D-30	IGKV1D-16	IGKV3D-15	IGKV1D-13	IGKV1D-17
>VH3-23	12	6	8	5	7	4	5	6	1	1	4	4	4	2	1	0	2	0	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0
>VH3-30	6	9	8	5	6	8	3	2	6	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
>VH4-39	10	11	10	16	3	5	2	4	0	2	1	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-59	10	12	2	2	6	4	0	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH4-34	21	13	4	5	6	4	4	2	1	0	2	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	7	5	3	4	7	4	4	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	9	12	4	2	5	2	1	3	0	1	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
>VH3-7	3	5	2	3	2	3	2	0	2	1	2	1	3	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH1-18	11	5	5	1	2	3	5	6	0	2	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-48	6	5	1	5	4	6	2	5	1	0	2	1	3	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	4	6	3	6	4	1	3	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	6	6	5	4	2	3	2	3	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH4-31	2	3	1	3	1	4	2	3	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	4	3	3	2	2	0	1	1	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	5	4	1	3	3	0	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-53	2	4	2	4	4	0	1	5	1	0	1	1	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
>VH3-11	2	4	3	3	2	2	2	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-9	0	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	2	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-74	1	2	2	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	4	2	2	3	2	3	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	4	1	1	2	1	0	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	0	3	0	2	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	1	1	0	2	1	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-3	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	2	3	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	2	1	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-4.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH2-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH6-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Фиг. 41

457.0	IGLV 2-14	IGLV 1-40	IGLV 1-44	IGLV 1-51	IGLV 1-47	IGLV 2-23	IGLV 3-21	IGLV 2-11	IGLV 3-1	IGLV 2-8	IGLV 6-57	IGLV 1-36	IGLV 3-25	IGLV 4-69	IGLV 7-43	IGLV 7-46	IGLV 2-18	IGLV 3-27	IGLV 9-49	IGLV 3-10	IGLV 3-9	IGLV 8-61	IGLV 3-12	IGLV 3-19	IGLV 3-22
>VH3-23	7	5	0	1	1	3	4	3	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
>VH3-30	6	2	2	5	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
>VH4-39	8	4	4	4	0	3	0	0	1	9	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-59	1	8	1	4	1	2	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-34	8	4	2	7	4	2	1	0	0	4	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	6	11	4	0	2	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	7	7	2	4	1	3	1	2	2	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-7	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-18	3	3	2	1	0	0	0	1	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH3-48	3	1	1	1	2	0	1	1	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	2	0	0	6	2	1	0	2	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	1	0	3	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH4-31	3	3	1	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	6	3	2	2	0	2	1	1	3	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	3	1	0	0	3	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
>VH3-53	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-11	0	0	1	1	1	0	2	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
>VH3-9	4	0	3	0	3	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-74	1	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	2	0	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	1	0	3	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	1	0	4	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	0	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-3	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Фиг. 42

470.0	IGKV3-20	IGKV1-39/1D-39	IGKV1-5	IGKV3-15	IGKV4-1	IGKV3-11	IGKV2-28/2D-28	IGKV1-33/1D-33	IGKV1-9	IGKV2-30	IGKV1-17	IGKV1-27	IGKV1-8	IGKV1-15	IGKV1-12	IGKV1-6	IGKV2D-29	IGKV1-13	IGKV2-24	IGKV1D-8	IGKV2-29	IGKV5-2	IGKV3D-20	IGKV1D-12	IGKV2-40/2D-40	IGKV1D-43	IGKV2D-30	IGKV1D-16	IGKV3D-15	IGKV1D-13
>VH3-23	12	4	18	11	6	5	2	0	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH3-30	5	3	1	4	5	3	1	0	1	1	1	0	2	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-39	3	7	4	6	2	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
>VH4-59	3	7	1	6	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
>VH4-34	4	5	1	2	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	3	4	2	3	1	2	0	1	1	2	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	3	2	1	5	3	4	2	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
>VH3-7	3	2	0	4	3	1	1	0	0	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-18	4	3	0	3	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-48	6	3	0	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	1	1	4	3	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	4	0	1	0	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-31	3	1	3	1	1	2	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	4	3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	1	2	4	3	3	2	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-53	0	1	1	2	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-11	1	1	3	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-9	1	0	1	1	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-74	2	1	1	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	2	3	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	2	1	2	1	0	2	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	2	0	1	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	0	2	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH1-3	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-4.1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Фиг. 43

322.0	IGLV 2-14	IGLV 1-40	IGLV 1-44	IGLV 1-51	IGLV 1-47	IGLV 2-23	IGLV 3-21	IGLV 2-11	IGLV 3-1	IGLV 2-8	IGLV 6-57	IGLV 1-36	IGLV 3-25	IGLV 4-69	IGLV 7-43	IGLV 7-46	IGLV 2-18	IGLV 3-27	IGLV 9-49	IGLV 3-10	IGLV 3-9	IGLV 8-61	IGLV 3-12	IGLV 3-19	IGLV 3-22	IGLV 4-60
>VH3-23	6	1	5	2	0	1	2	2	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-30	1	3	2	4	1	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
>VH4-39	5	2	3	1	3	2	13	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
>VH4-59	3	0	3	0	2	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
>VH4-34	2	2	0	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH5-51	5	3	1	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-69	1	0	6	1	1	0	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
>VH3-7	1	3	2	2	2	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-18	2	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-48	1	0	0	0	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-21	3	2	2	3	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-15	0	2	1	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-31	3	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-2	2	3	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-33	1	0	1	1	1	4	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-53	2	0	9	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-11	3	1	2	0	0	2	0	3	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-9	2	1	1	1	0	3	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
>VH3-74	1	0	0	0	0	3	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-4	2	3	2	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-46	2	1	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-61	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-8	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-3	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-49	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-28	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-43	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-64	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-81	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-72	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH1-58	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-66	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH7-4.1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH2-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH6-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH4-30.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>VH3-20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Фиг. 44

	Matsuda et al	Tomlinson et al	Последовательность белка
IGHV1-2	VH 1-2	DP-75	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG WINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
IGHV1-3	VH 1-3	DP-25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMG WSNAGNGNTKYSQEFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCAR
IGHV1-8	VH 1-8	DP-15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG
IGHV1-18	VH 1-18	DP-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
IGHV1-24	VH 1-24	DP-5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMG GFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
IGHV1-45	VH 1-45	--	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYRYLHWVRQAPGQALEWMG WITPFNGNTNYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCAR
IGHV1-46	VH 1-46	DP-7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
IGHV1-58	VH 1-58	DP-2	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTSSAMQWVRQARGQRLEWIGW IVVGSGNTNYAQKFQERVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
IGHV1-69*01	VH 1-69	DP-10	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
IGHV1-69*06, IGHV1-e	VH 1-69	DP-88	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
IGHV1-c	--	--	KSGASVKVSCSFSGFTITSYGIHWVQQSPGQGLEWMGWINPGNGSPSYAKK FQGRFTMTRDMSTTTAYTDLSSLTSEDMAVYYYAR
IGHV1-f	--	DP-3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHWVQQAPGKGLEWMGL VDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
IGHV2-5	VH 2-5	DP-76	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALI YWNDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHR
IGHV2-26	VH 2-26	DP-26	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAH IFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARI
IGHV2-70	VH 2-70	DP-27	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMCVSWIRQPPGKALEWLALI DWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARI
IGHV3-7	VH 3-7	DP-54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-9	VH 3-9	DP-31	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSG ISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD

Фиг. 45A

IGHV3-11	VH 3-11	DP-35	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYI SSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-13	VH 3-13	DP-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQATGKGLEWVSA IGTAGDTYYPGSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR
IGHV3-15	VH 3-15	DP-38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVG RIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
IGHV3-16	VH 3-16		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSDMNWARKAPGKGLEWVSG VSWNGSRTHYVDSVK.RRFIISRDNSRNSLYLQKNRRRAEDMAVYYCVR
IGHV3-20	VH 3-20	DP-32	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVS GINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR
IGHV3-21	VH 3-21	DP-77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI SSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-23	VH 3-23	DP-47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-30	VH 3-30	DP-49	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-30-3	--	DP-46	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-30-5	--	--	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-33	VH 3-33	DP-50	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-35	VH 3-35	DP-59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSDMNWVHQAPGKGLEWVSG VSWNGSRTHYADSVKGRFIISRDNSRNTLYLQTNSLRAEDTAVYYCVR
IGHV3-38	VH 3-38P	--	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAASGFTVSSNEMSWIRQAPGKGLEWVSSi SGGSTYYADSRKGRFTISRDNSKNTLYLQMNNLRAEGTAAYYCARY
IGHV3-43	VH 3-43	DP-33	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAPGKGLEWVSLI SWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD
IGHV3-48	VH 3-48	DP-51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSY ISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
IGHV3-49	VH 3-49	3-49RB	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQAPGKGLEWVGF IRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
IGHV3-53	VH 3-53	DP-42	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-64	VH 3-64	DP-61	EVQLVESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEYVSAI SSNGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR
IGHV3-66	VH 3-66	DP-86	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSCGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-72	VH 3-72	DP-29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVG RTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
IGHV3-73	VH 3-73	DA-11	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGR IRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
IGHV3-74	VH 3-74	DP-53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVS RINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

Фиг. 45B

IGHV3-d	--	--	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNEMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGGSTYYADSRKGRFTISRDNSKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK
IGHV4-4	VH 4-4	DP-70	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIY TSGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-28	VH 4-28	DP-68	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISSSNWWGWIRQPPGKGLEWIGYI YYSGSTYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCAR
IGHV4-30-1	--	--	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG YIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-30-2	--	DP-64	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGYSWSWIRQPPGKGLEWIG YIYHSGSTYYNPSLKSRVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-30-4	--	DP-78	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-31	VH 4-31	DP-65	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG YIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-34	VH 4-34	DP-63	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI NHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG
IGHV4-39	VH 4-39	DP-79	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-59	VH 4-59	DP-71	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY YSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-61	VH 4-61	DP-66	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV4-b	--	DP-67	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YHSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGHV5-51	VH 5-51	DP-73	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
IGHV5-a	--	--	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGRI DPSDSYTNYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
IGHV6-1	VH 6-1	DP-74	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG RTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
IGHV7-4-1	--	DP-21	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMG WINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR
IGHV7-81	VH 7-81	--	QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYSFTTYGMNWVPQAPGQGLEWMG WFNTYTGNPTYAQGFTGRFVFSMDTSASTAYLQISSLKAEDMAMYYCAR

51 функциональная
5 открытых рамок считывания

Фиг. 45C

	Zachau	Последовательность белка
IGKV1-5	L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYS
IGKV1-6	L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYP
IGKV1-8	L9	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYYSYP
IGKV1-9	L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYP
IGKV1-12	L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP
IGKV1-13	L4/18a	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP
IGKV1-16	L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP
IGKV1-17	A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP
IGKV1-27	A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAP
IGKV1-33	O18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLP
IGKV1-37	O14	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYRQKPGKVPKLLIYSASNL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYGQRTYNAPP
IGKV1-39	O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP
IGKV1D-08	L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWYQQKPGKAPELLIYAAST LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYYSFP
IGKV1D-12	L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP
IGKV1D-13	L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNNYP
IGKV1D-16	L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP
IGKV1D-17	L14	NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGISNYLAWFQQKPGKVPKHLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP
IGKV1D-33	O8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLP
IGKV1D-37	O4	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYRQKPGKVPKLLIYSASNL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYGQRTYNAPP

Фиг. 46A

IGKV1D-39	O2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP
IGKV1D-42	L22	DIQMIQSPSFLSASVGDRVSIICWASEGISSNLAWYLQKPGKSPKLFLYDAKDL HPGVSSRFSGRGSGTDFTLTIISLKPEDFAAYYCKQDFSYPP
IGKV1D-43	L23	AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLFIYYASSL QSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTP
IGKV2-24	A23	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLI YKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFP
IGKV2-28	A19	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
IGKV2-29	A18b	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLI YEVSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP
IGKV2-30	A17	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP
IGKV2-40	O11	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLL IYTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP
IGKV2D-24	A7	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISFRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCTQATQFP
IGKV2D-26	A5	EIVMTQTPLSLSITPGEQASISCRSSQSLLHSDGYTYLYWFLQKARPVSTLLIYE VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFGVYYCMQDAQDPP
IGKV2D-28	A3	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
IGKV2D-29	A2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLI YEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLP
IGKV2D-30	A1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVSNWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP
IGKV2D-40	O1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLL IYTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP
IGKV3-7	L10	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATSIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDHNLPP
IGKV3-11	L6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP
IGKV3-15	L2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP

Фиг. 46B

IGKV3-20	A27	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
IGKV3D-07	L25	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLP
IGKV3D-11	L20	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWH
IGKV3D-15	L16	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP
IGKV3D-20	A11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGLAPRLLIYDAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
IGKV4-1	B3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP
IGKV5-2	B2	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGEAAIFIIQEATTL VPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFP
IGKV6-21	A26	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQS FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP
IGKV6D-21	A10	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQS FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP
IGKV6D-41	A14	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCQASEGIGNYLYWYQQKPDQAPKLLIKYASQ SISGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQGNKHP

38 функциональных
8 открытых рамок считывания

Фиг. 46C

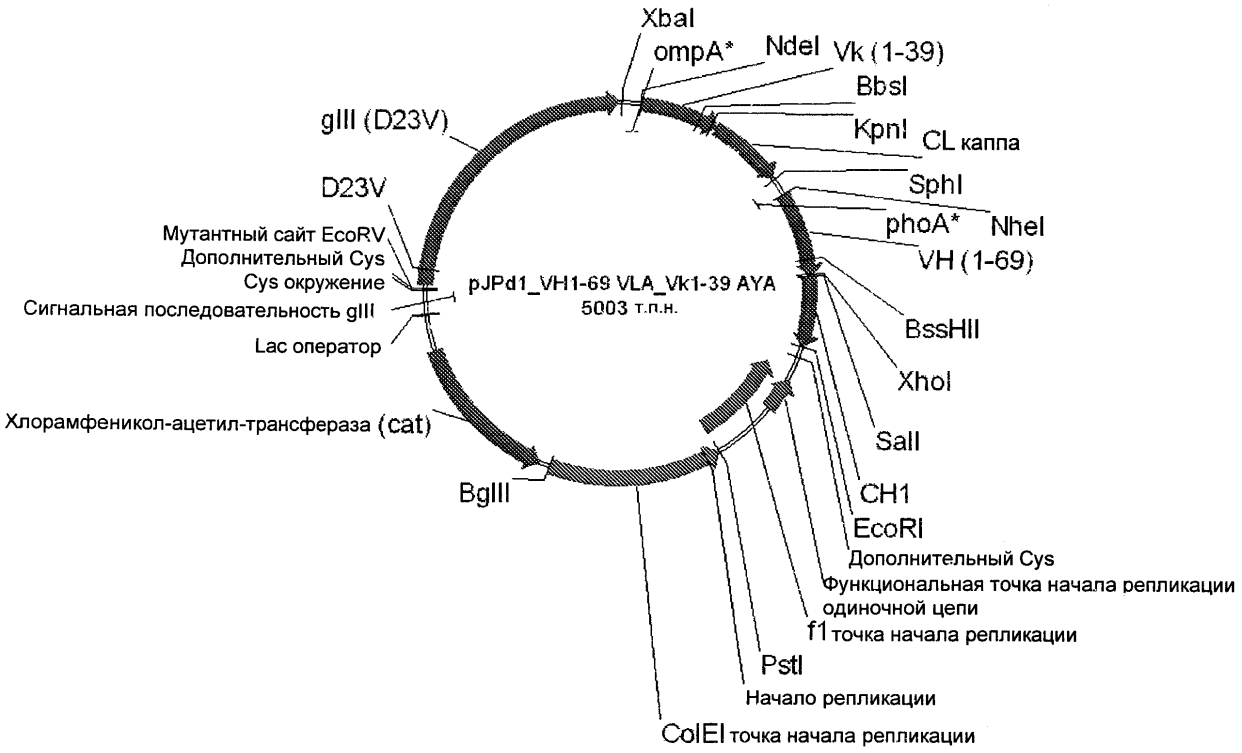
	Kawasaki et al	Frippiat et al	Последовательность белка
IGLV1-36	VL 1-11	1a	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDD LLPSGVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP
IGLV1-40	VL 1-13	1e	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYG NSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGS
IGLV1-44	VL 1-16	1c	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP
IGLV1-47	VL 1-17	1g	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYSNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGP
IGLV1-50	VL 1-18	1f	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYG NSNRPSGVPDQFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCKAWDNSLNA
IGLV1-51	VL 1-19	1b	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNN KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAG
IGLV2-08	VL 1-2	2c	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIY EVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNF
IGLV2-11	VL 1-3	2e	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIY DVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSYTF
IGLV2-14	VL 1-4	2a2	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYE VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTL
IGLV2-18	VL 1-5	2d	QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSYNRVSWYQQPPGTAPKLMIYE VSNRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSLYTSSSTF
IGLV2-23	VL 1-7	2b2	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIYE GSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSSTF
IGLV2-33	VL 1-9	2f	QSALTQPPFVSGAPGQSVTISCTGTSSDVGDYDHVFWYQKRLSTTSRLLIYN VNTRPSGISDLFSGSKSGNMASLTISGLKSEVEANYHCSLYSSSYTF
IGLV3-1	VL 2-1	3r	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSK RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTA
IGLV3-9	VL 2-6	3j	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSN RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTA
IGLV3-10	VL 2-7	3p	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSK RPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNH
IGLV3-12	VL 2-8	3i	SYELTQPHSVSVATAQMARITCGGNNIGSKAVHWYQQKPGQDPVLVIYSDSN RPSGIPERFSGSNPGNTATLTISRIEAGDEADYYCQVWDSSSDHP
IGLV3-16	VL 2-11	3a	SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGEALPKKYAYWYQQKPGQFPVLVIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGVQAEDEADYYCLSADSSGTYP
IGLV3-19	VL 2-13	3l	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNN RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHL
IGLV3-21	VL 2-14	3h	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDS DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHP
IGLV3-22	VL 2-15	3e	SYELTQLPSVSVSPGQTARITCSGDVLGENYADWYQQKPGQAPELVIYEDSE RYPGIPERFSGSTSGNTTTLTISRVLTEDEADYYCLSGDEDNP
IGLV3-25	VL 2-17	3m	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCQSADSSGTYP
IGLV3-27	VL 2-19	--	SYELTQPSSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQQKPGQAPVLVIYKDSE RPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGAQVEDEADYYCYSAADNNL

Фиг. 47 А

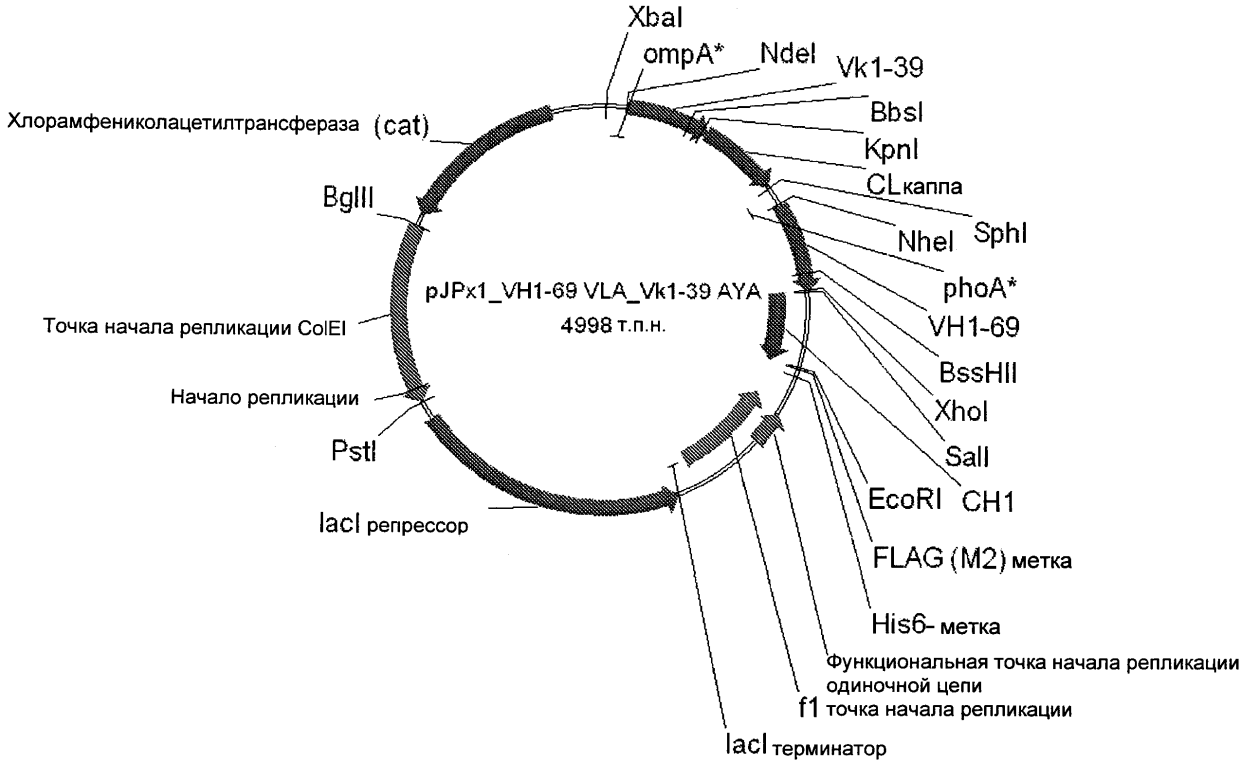
IGLV3-32	VL 2-23P	3i1	SSGPTQVPAVSVALGQMARITCQGDSMEGSYEHWYQQKPGQAPVLVIYDSS DRPSRIPERFSGSKSGNTTTLTITGAQAEDEADYYYQLIDNHA
IGLV4-3	VL 5-1	4c	LPVLTQPPSASALLGASIKLTCTLSSEHSTYTIEWYQQRPGRSPQYIMKVKSD GSHSKGDGIPDRFMGSSSGADRYLTFSNLQSDDEAEYHCGESHTIDGQVG
IGLV4-60	VL 5-4	4a	QPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSSYIIAWHQQQPGKAPRYLMKLEG SGSYNKGSGVPDRFSGSSSGADRYLTISNLQFEDEADYYCETWDSNT
IGLV4-69	VL 5-6	4b	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHQQQPEKGPRYLMKLNS DGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCQTWGTG
IGLV5-37	VL 4-1	5e	QPVLTQPPSSSASPGESARLTCTLPSDINVGSYNIYWYQQKPGSPPRYLLYYY SDSDKGQGSGVPSRFSGSKDASANTGILLISGLQSEDEADYYCMIWPSNAS
IGLV5-39	--	5a	QPVLTQPTSLSASPGASARFTCTLRSGINVGTYRIYWYQQKPGSLPRYLLRYK SDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASTNAGLLLISGLQSEDEADYYCAIWYSSTS
IGLV5-45	VL 4-2	5c	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWYQQKPGSPPQYLLRYK SDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAS
IGLV5-48	VL 4-3	5d	QPVLTQPTSLSASPGASARLTCTLRSGINLGSYRIFWYQQKPESPPRYLLSYY SDSSKHQGSGVPSRFSGSKDASSNAGILVISGLQSEDEADYYCMIWHSSAS
IGLV5-52	VL 4-4	5b	QPVLTQPSSHSASSGASVRLTCMLSSGFSVGDFWIRWYQQKPGNPPRYLLY YHSDSNKGQGSGVPSRFSGSNDASANAGILRISGLQPEDEADYYCGTWHSN
IGLV6-57	VL 1-22	6a	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYED NQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSN
IGLV7-43	VL 3-2	7a	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYPNWFQQKPGQAPRALIYS TSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCLLYYGGAQ
IGLV7-46	VL 3-3	7b	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYPYWFQQKPGQAPRTLIYD TSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCLLSYSGAR
IGLV8-61	VL 3-4	8a	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPSWYQQTPGQAPRTLIYS TNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCVLYMGSGIS
IGLV9-49	VL 5-2	9a	QPVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSSGYSNYKVDWYQQRPGKGPRFVMRVG TGGIVGSKGDGIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHCGADHGSGSNFV
IGLV10-54	VL 1-20	10a	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNIVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYR NNNRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYYCSALDSSLSA
IGLV11-55	VL 4-6	--	RPVLTQPPSLSASPGATARLPCTLSSDLSVGGKNMFWYQQKPGSSPRLFLY HYSDSDKQLGPGVPSRVSGSKETSSNTAFLLISGLQPEDEADYYCQVYESSA

33 функциональных
5 открытых рамок считывания

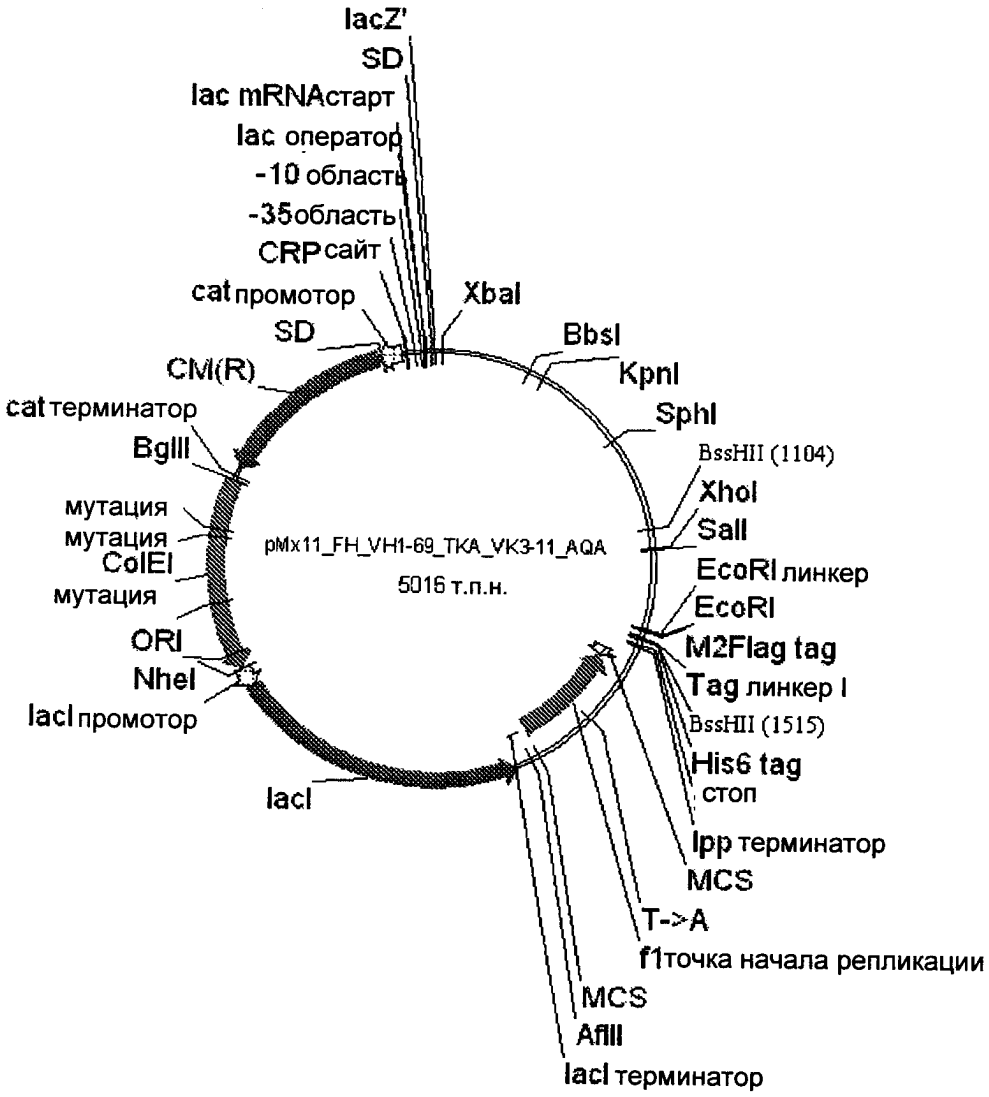
Фиг. 47B


XbaI
ompA*
NdeI
Vk (1-39)
BbsI
KpnI
CL каппа
SphI
NheI
phoA*
VH (1-69)
BssHII
XhoI
SalI
CH1
EcoRI
Дополнительный Cys
Функциональная точка начала репликации одиночной цепи
f1 точка начала репликации
PstI
Начало репликации
ColEI точка начала репликации
BglII
Хлорамфеникол-ацетил-трансфераза (cat)
Lac оператор
Сигнальная последовательность gIII
Cys окружение
Дополнительный Cys
Мутантный сайт EcoRV
D23V
gIII (D23V)
pJPd1_VH1-69 VLA_Vk1-39 AYA
5003 т.п.н.

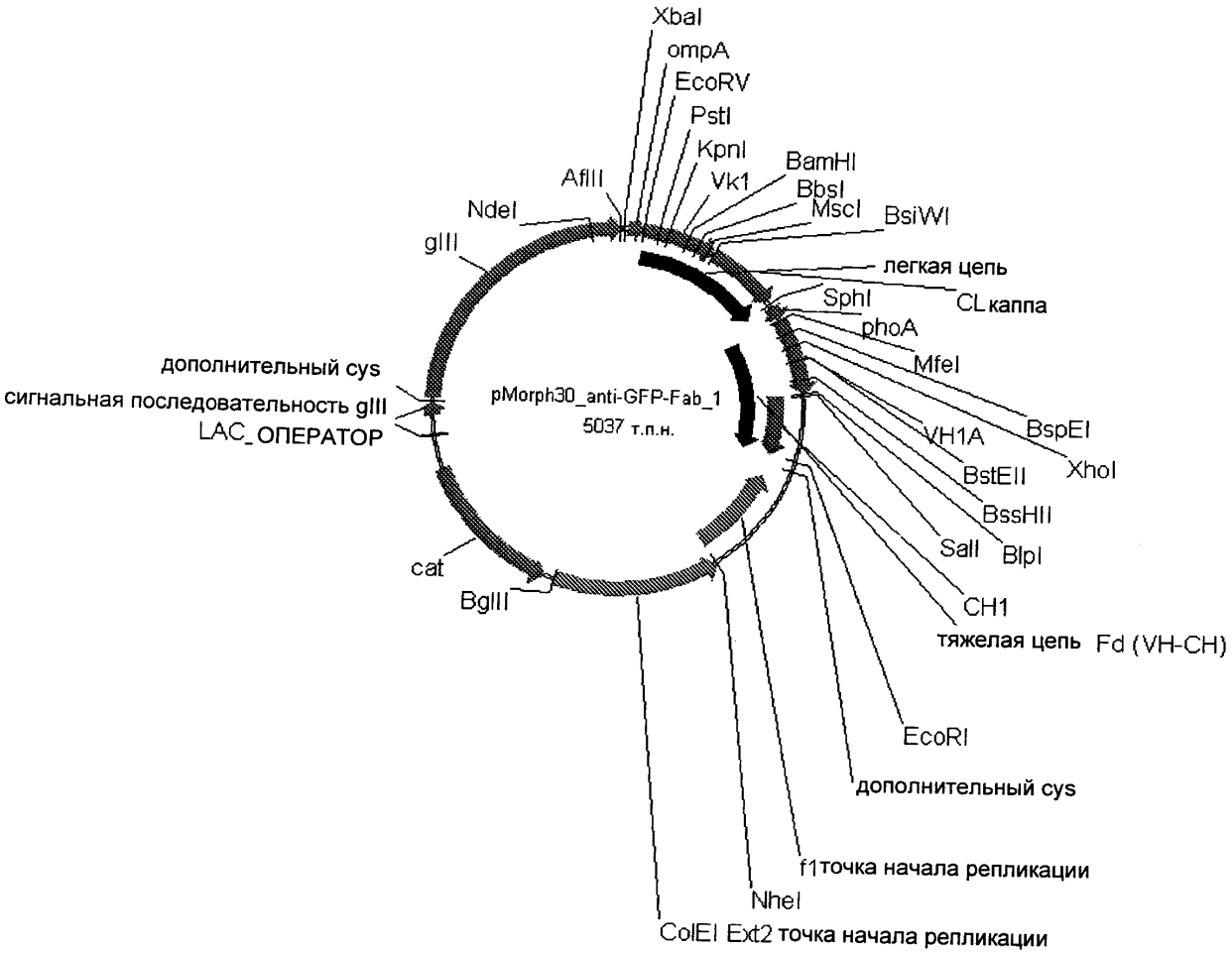
Фиг. 48


XbaI
ompA*
NdeI
Vk1-39
BbsI
KpnI
CLкаппа
NheI
SphI
phoA*
VH1-69
BssHII
XhoI
SalI
EcoRI
CH1
FLAG (M2) метка
His6- метка
Функциональная точка начала репликации одиночной цепи
f1 точка начала репликации
lacI терминатор
lacI репрессор
PstI
Начало репликации
Точка начала репликации ColEI
BglII
Хлорамфениколацетилтрансфераза (cat)
pJPx1_VH1-69 VLA_Vk1-39 AYA
4998 т.п.н.

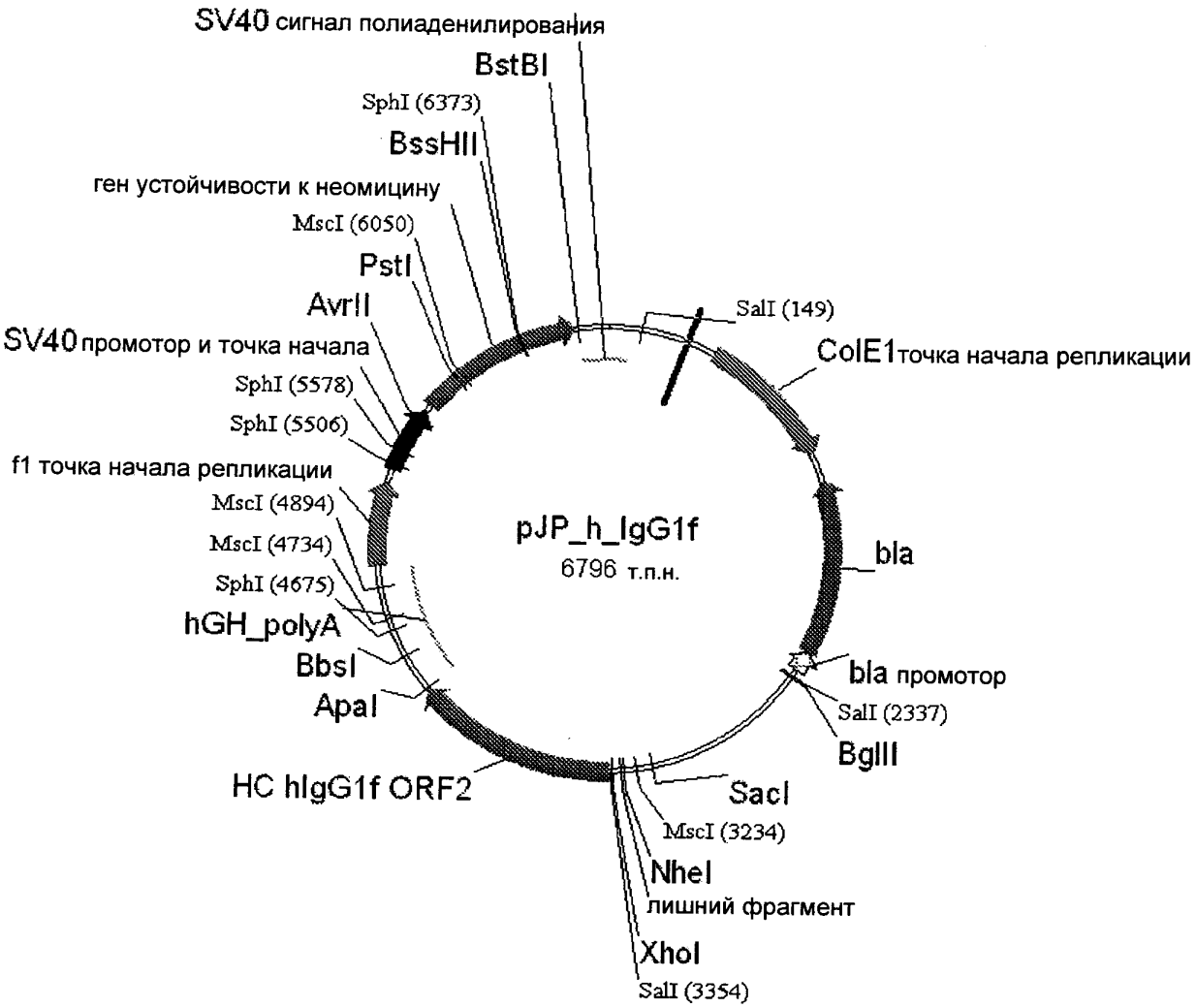
Фиг. 49


lacZ'
SD
lac mRNAстарт
lac оператор
-10 область
-35область
CRP сайт
cat промотор
SD
CM(R)
cat терминатор
BglII
мутация
мутация
ColEI
мутация
ORI
NheI
lacI промотор
lacI
XbaI
BbsI
KpnI
SphI
BssHII (1104)
XhoI
SalI
EcoRI линкер
EcoRI
M2Flag tag
Tag линкер I
BssHII (1515)
His6 tag
стоп
lpp терминатор
MCS
T->A
f1точка начала репликации
MCS
AflII
lacI терминатор
pMx11_FH_VH1-69_TKA_VK3-11_AQA
5016 т.п.н.

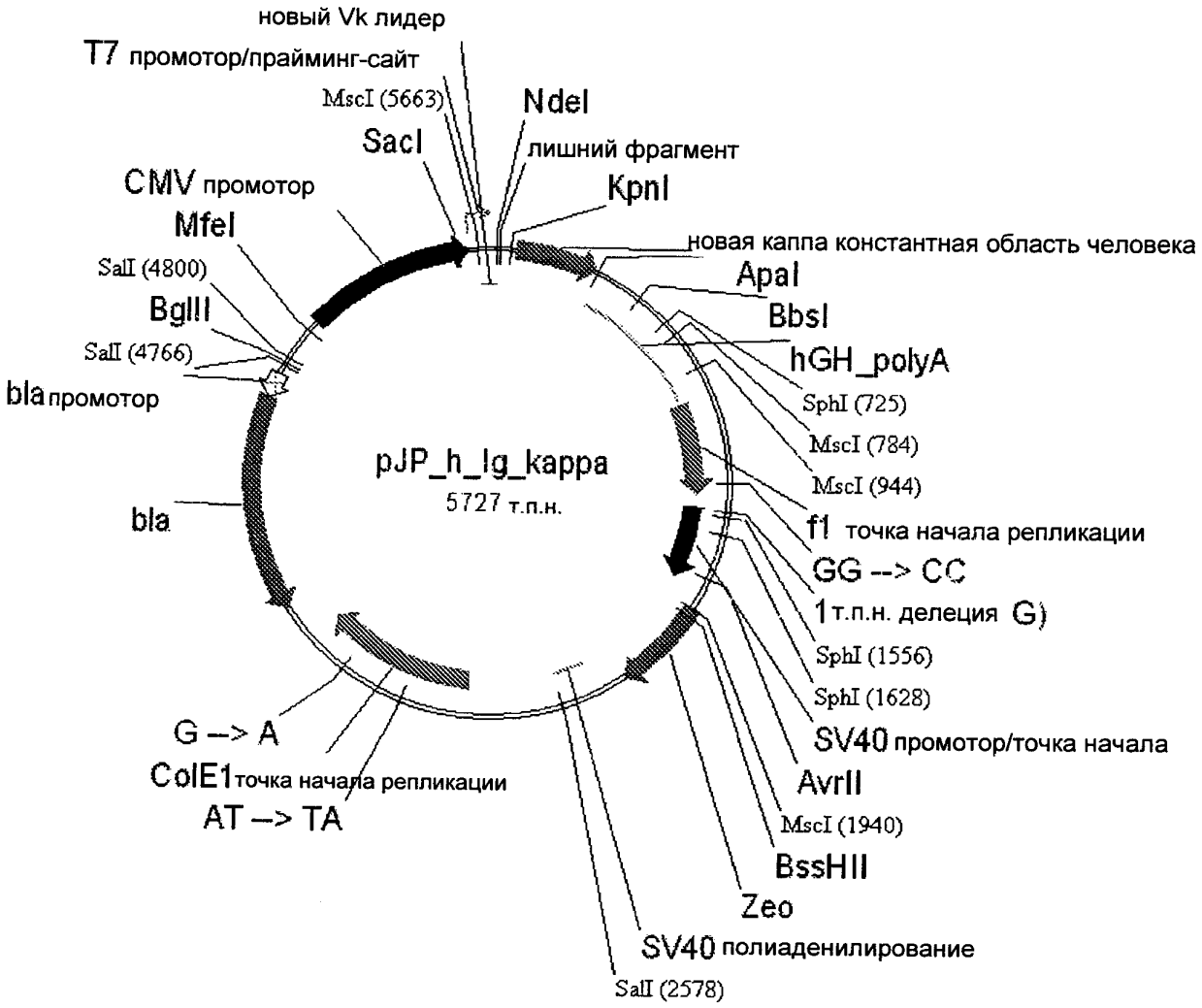
Фиг. 50


XbaI
ompA
EcoRV
PstI
KpnI
BamHI
Vk1
BbsI
AflII
MscI
NdeI
BsiWI
gIII
легкая цепь
CL каппа
SphI
phoA
дополнительный cys
сигнальная последовательность gIII
LAC_ОПЕРАТОР
pMorph30_anti-GFP-Fab_1
5037 т.п.н.
MfeI
BspEI
VH1A
XhoI
BstEII
BssHII
SalI
BlpI
cat
BglII
CH1
тяжелая цепь Fd (VH-CH)
EcoRI
дополнительный cys
f1точка начала репликации
NheI
ColEI Ext2 точка начала репликации

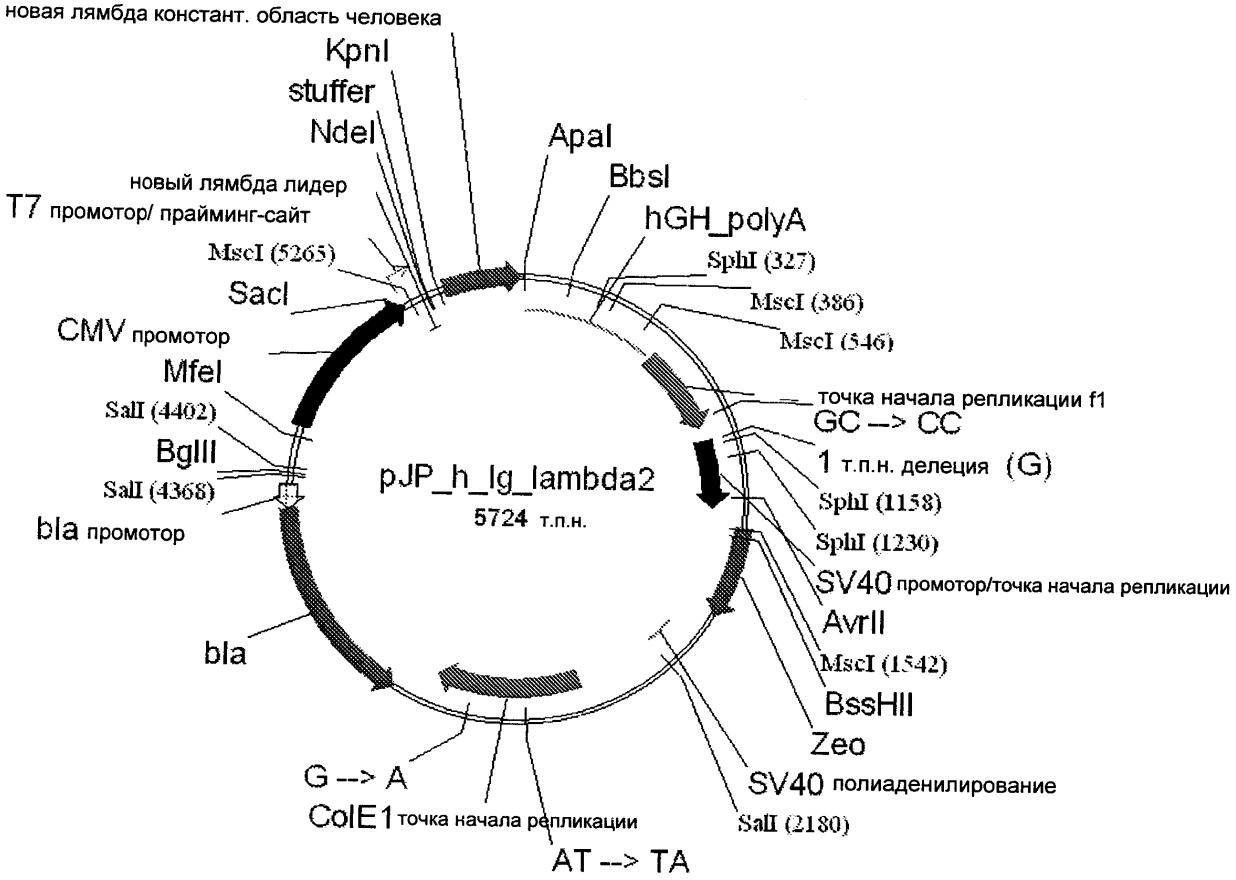
Фиг. 51


SV40 сигнал полиаденилирования
BstBI
SphI (6373)
BssHII
ген устойчивости к неомицину
MscI (6050)
PstI
AvrII
SV40 промотор и точка начала
SphI (5578)
SphI (5506)
f1 точка начала репликации
MscI (4894)
MscI (4734)
SphI (4675)
hGH_polyA
BbsI
ApaI
HC hIgG1f ORF2
SalI (149)
ColE1 точка начала репликации
pJP_h_IgG1f
6796 т.п.н.
bla
bla промотор
SalI (2337)
BglII
SacI
MscI (3234)
NheI
лишний фрагмент
XhoI
SalI (3354)

Фиг. 52


новый Vk лидер
T7 промотор/прайминг-сайт
MscI (5663)
NdeI
SacI
лишний фрагмент
CMV промотор
KpnI
MfeI
новая каппа константная область человека
SalI (4800)
ApaI
BglII
BbsI
SalI (4766)
hGH_polyA
bla промотор
SphI (725)
MscI (784)
pJP_h_Ig_kappa
5727 т.п.н.
MscI (944)
bla
f1 точка начала репликации
GG --> CC
1 т.п.н. делеция G)
SphI (1556)
SphI (1628)
G --> A
SV40 промотор/точка начала
ColE1 точка начала репликации
AvrII
AT --> TA
MscI (1940)
BssHII
Zeo
SV40 полиаденилирование
SalI (2578)

Фиг. 53



Фиг. 54

Относительный дисплей Fab в ИФА (pJPd1)			hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1-40	hVL_1-47	hVL_1-51	hVL_2-11	hVL_2-14	hVL_2-23	hVL_3-1	hVL_3-21
1	hVH_1_2	A	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0			0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.4	0.0
2	hVH_1_18	B	2.0	0.6		1.6	2.0		1.2	3.7	1.9		2.6	2.2	2.4			1.9	2.5	4.3	4.4	3.4
3	hVH_1_46	C			3.0		1.3	1.3		2.5			3.0				5.7	1.6		2.7	4.3	5.2
4	hVH_1_69*01	D	2.1	2.9		2.1	1.2	0.9	0.2	3.5			1.6					0.8		1.8	3.4	4.6
5	hVH_3_07	E			6.7	10.6	7.0	10.5	14.5	27.3	13.0		14.5		8.2	6.3			11.3	6.9	5.0	
6	hVH_3_11	F	5.5	4.3	6.7	8.2	10.3		6.0	29.0		0.0	4.6		12.4	8.1		8.4	6.4	8.9		9.8
7	hVH_3_15	G	8.1	11.7	10.0	11.5	14.5	6.4	7.8	14.2		19.4	12.1	8.9	16.7	13.0	11.0	10.5	9.7	10.1	9.4	9.2
8	hVH_3_21	H	10.0	16.1		11.3		5.0	8.7	11.6						0.0			6.5	8.8		11.8
9	hVH_3_23	I			6.1		8.4		17.1	10.8	4.1			13.3			10.2	13.6	9.1	7.4	4.6	7.4
10	hVH_3_30	J				5.4			9.1	13.1										9.5	8.8	16.6
11	hVH_3_33	K											12.3							17.1		
12	hVH_3_48	L					8.7		8.9				12.1			10.3				9.3	6.0	
13	hVH_3_53	M	11.1		8.3	14.8	10.7	2.9	6.9		1.3		9.6				6.4	7.2		6.3	5.1	
14	hVH_3_73	N	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	3.6	0.2		0.5	0.2			0.0	0.3	0.2		0.8	0.0	0.4
15	hVH_3_74	O	6.4	9.5	8.7	8.4	8.0		5.0	8.7			10.0		8.8	3.2	7.1		4.7		7.0	1.8
16	hVH_4_04*03	P			4.5		3.2				0.3					8.3				2.7	2.2	5.2
17	hVH_4_31	Q													0.0	0.0			0.0		1.4	
18	hVH_4_39	R	0.0	1.6				0.7		2.1					0.6				2.0	0.9	3.6	
19	hVH_5_51	S			2.6	1.8	1.3		0.4	3.7	0.9		1.9					0.0	2.1	3.0	3.8	
20	hVH_6_1	T		3.3	5.9	1.5									7.2			1.0		2.1		0.4

Значения иллюстрируют Fab дисплей по сравнению с контролем; более высокие числа указывают на более высокие уровни дисплея

Фиг. 55

Относительная экспрессия Fab в ИФА и BEL (pJPx)			hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1-40	hVL_1-47	hVL_1-51	hVL_2-11	hVL_2-14	hVL_2-23	hVL_3-1	hVL_3-21
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	hVH_1_2	A	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	hVH_1_18	B	0.4	0.5		0.5		0.5	0.4	0.3	0.5	0.6	0.5	0.9		0.8			0.6	0.7	0.6	0.6
3	hVH_1_46	C	0.4		0.6	0.5	0.6			0.4	0.2		0.7		1.0					1.0		
4	hVH_1_69*01	D	0.5		0.3	0.4		0.3	0.3	0.1		0.7	0.5	0.5	1.0		0.8	0.7	0.8		0.7	0.7
5	hVH_3_07	E	0.7	0.9	0.4	0.9		0.5	0.5	0.3			0.7			1.2	1.0			0.8	0.5	0.7
6	hVH_3_11	F	0.5	0.6		0.6	0.6				0.4		0.7			0.8	1.1		0.9	1.0	0.5	
7	hVH_3_15	G	0.5	0.6	0.5	0.7	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3		0.6		0.9	1.2	1.1	0.9	0.8		0.3	0.8
8	hVH_3_21	H		1.0		0.6	0.9		0.6	0.5	0.6		0.8		1.0	1.2		0.9	0.9	1.0	0.7	0.9
9	hVH_3_23	I	0.8	0.7	0.8	0.9	0.6	0.6			0.3		0.7				1.1			0.9	0.4	0.8
10	hVH_3_30	J		1.0		0.8	0.9		0.4	0.0	0.4	0.4	0.7	0.7		1.1		0.7	0.8	1.0	0.6	0.8
11	hVH_3_33	K	0.3		0.7	0.2			0.6				0.6	1.0		1.1		0.5	0.9	0.5	0.2	0.8
12	hVH_3_48	L							0.7					0.8	0.8		1.2				0.8	
13	hVH_3_53	M	0.7	0.7	0.9	0.7	0.0	0.5	0.4	0.6	0.3	0.8	0.7	0.3	1.1	1.1	1.3	0.8	1.0	1.1	0.6	0.8
14	hVH_3_73	N	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2		0.1	0.2	0.1		0.1		0.1	0.3	0.2	0.2			0.1	0.2
15	hVH_3_74	O		0.9	0.6	0.6		0.6	0.6		0.4		0.8	0.7	0.4	1.2	1.1	0.6			0.6	0.6
16	hVH_4_04*03	P	0.8	0.8	0.1	0.7	0.2	0.4	0.4	0.2	0.5	0.6	0.6	1.1	1.0		0.9	1.0	0.7	1.0	0.6	0.7
17	hVH_4_31	Q	0.0		0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0		0.1		0.6	0.7	0.9	0.5		0.0	0.3	0.4
18	hVH_4_39	R	0.3		0.5			0.3		0.3	0.2	0.3	0.6	0.6	0.9	0.7	0.8		0.6	0.7	0.5	0.6
19	hVH_5_51	S	0.5	0.5	0.5			0.3	0.2	0.3	0.2	1.0			1.0	1.0	1.1	0.7		1.0	0.7	
20	hVH_6_1	T	0.7	0.6		0.0		0.5	0.5	0.3	0.3		0.7	0.9		1.1	1.1	1.0		0.8	0.5	0.8

Значения отображают экспрессию Fab по сравнению с контролем; более высокие числа указывают на более высокие уровни экспрессии Fab

Фиг. 56

Относительная термостабильность Fab в ИФА и BEL (pJPx1)			hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1-40	hVL_1-47	hVL_1-51	hVL_2-11	hVL_2-14	hVL_2-23	hVL_3-1	hVL_3-21
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	hVH_1_2	A	bg	60	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg		4	4	4	4	4	4	4
2	hVH_1_18	B	60	60		60			70	60	60	60	70	60		60			60	60	60	60
3	hVH_1_46	C	60		60	60	60			60	4		60		60					60		
4	hVH_1_69*01	D	60		60	60		4	70	4		60	70	60	60		60	60	60			60
5	hVH_3_07	E	60	60	60	70		4	70	60			70			60	60			60	60	60
6	hVH_3_11	F	60	60		60	60				4		60			60	60		60	60	60	
7	hVH_3_15	G	60	60	70	70	60	4	70	60	4		70		60	60	60	60	60		4	
8	hVH_3_21	H		60		60	60		60	60	4		60		60	60		60	60	60	60	60
9	hVH_3_23	I	60	60	70	60	60	4			4		70				60			60	60	60
10	hVH_3_30	J		60		60	60		60	bg	4	60	60	60		60		60	60	60	60	60
11	hVH_3_33	K	60		60	60			60				60	60		60		60	4	60	60	60
12	hVH_3_48	L							60					60			60					
13	hVH_3_53	M	4	60	60	60	bg	4	60	60	4	60	60	4	4	60	60	60	60	60	60	60
14	hVH_3_73	N	60	60	60	60	60		4	4	bg		60		60	4	60	4			60	60
15	hVH_3_74	O		60	60	60		60	70				70	60	4		60	60			60	60
16	hVH_4_04*03	P	60	60	bg	60	60	4	60	bg	4	bg	60	60	60		60	60	60	60	60	60
17	hVH_4_31	Q	bg		4	60	bg	bg	bg	60	bg		bg		60	60	60	60		60	60	60
18	hVH_4_39	R	60		4			4		60	4	60	70	60	70	70	60		60	60	60	60
19	hVH_5_51	S	60	60	60			4	60	60	4	60			60	60	60	60		60	60	
20	hVH_6_1	T	60	60		bg		60	70	60	4		70	60		60	60	60		60	60	60

Числа 60 и 70 указывают на пары VH/VL, которые стабильны в течение 45 мин при 60 или 70°C в тестируемой системе. Число 4 указывает на термонестабильные пары и bg (фон) указывает на низкие уровни экспрессии.

Фиг. 57

Относительная стабильность Fab в сыворотке кр.рог.скота в ИФА и BEL (pJPx1)			hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1-40	hVL_1-47	hVL_1-51	hVL_2-11	hVL_2-14	hVL_2-23	hVL_3-1	hVL_3-21
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	hVH_1_2	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		U	U	S	U	U	U	U
2	hVH_1_18	B	S	S		S		S	S	S	S	S	S	S		S			S	S	S	S
3	hVH_1_46	C	S		S	S	S			S	S		S		S					S		
4	hVH_1_69*01	D	S		U	S		S	S	S		S	S	S	S		S	S	S		S	S
5	hVH_3_07	E	S	S	S	S		S	S	S			S			S	S			S	S	S
6	hVH_3_11	F	S	S		S	U				S		S			S	S		S	S	S	
7	hVH_3_15	G	S	S	S	S	S	U	S	S	U		S		S	S	S	S	S		S	S
8	hVH_3_21	H		S		S	S		S	S	S		S		S	S		S	S	S	S	S
9	hVH_3_23	I	S	S	S	S	S	U			S		S				S			S	S	S
10	hVH_3_30	J		S		S	S		U	U	U	S	S	S		S		S	S	S	S	S
11	hVH_3_33	K	S		S	U			S				S	S		S		S	S	S	S	S
12	hVH_3_48	L							S					S	S		S				S	
13	hVH_3_53	M	S	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	hVH_3_73	N	S	S	S	S	S		S	S	S		S		S	S	S	S			S	S
15	hVH_3_74	O		S	S	S		S	S		S		S	S	S	S	S	S			S	S
16	hVH_4_04*03	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S		S	S	S	S	S	S
17	hVH_4_31	Q	S		S	S	S	bg	S	S	S		S		S	S	S	S		S	S	S
18	hVH_4_39	R	S		S			S		S	S	S	S		S	S	S		S	S	S	S
19	hVH_5_51	S	S	S	S			S	S	S					S	S	S	S		S	S	
20	hVH_6_1	T	S	S		S		S	S	S	S		S	S		S	S	S		S	S	S

S означает стабильный и U нестабильный в условиях тестирования; bg (фон)

Фиг. 58

Относительная стабильность Fab в мышиной сыворотке в ИФА и BEL (pJPx1)			hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1-40	hVL_1-47	hVL_1-51	hVL_2-11	hVL_2-14	hVL_2-23	hVL_3-1	hVL_3-21
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	hVH_1_2	A	U	S	U	S	S	S	S	S	S	S	U	S		U	U	S	U	U	U	U
2	hVH_1_18	B	S	S		S		S	S	S	S	S	S	S		S			S	S	S	S
3	hVH_1_46	C	S		S	S	S			S	U		S		S					S		
4	hVH_1_69*01	D	S		S	S		S	S	S		S	S	S	S		S	S	S		S	S
5	hVH_3_07	E	S	S	S	S		S	S	U			S			S	S			S	S	S
6	hVH_3_11	F	S	S		S	S				S		S			S	S		S	S	S	
7	hVH_3_15	G	S	S	S	S	S	U	S	S	S		S		S	S	S	S	S		S	S
8	hVH_3_21	H		S		S	S		S	S	S		S		S	S		S	S	S	S	S
9	hVH_3_23	I	S	S	S	S	S	S			S		S				S			S	S	S
10	hVH_3_30	J		S		S	S		S	U	S	S	S	S		S		S	S	S	S	S
11	hVH_3_33	K	S		S	S			S				S	S		S		S	S	S	S	S
12	hVH_3_48	L							S					S	S		S				S	
13	hVH_3_53	M	U	S	S	S	bg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	hVH_3_73	N	S	S	S	S	S		S	S	S		S		S	S	S	S			S	S
15	hVH_3_74	O		S	S	S		S	S		S		S	S	S	S	S	S			S	S
16	hVH_4_04*03	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
17	hVH_4_31	Q	S		S	S	S	U	S	S	S		S		S	S	S	S		S	S	S
18	hVH_4_39	R	S		S			S		S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S
19	hVH_5_51	S	S	S	S			S	S	S	S	S			S	S	S	S		S	S	
20	hVH_6_1	T	S	S		U		S	S	S	S		S	S		S	S	S		S	S	S

S означает стабильный и U нестабильный в условиях тестирования; bg (фон)

Фиг. 59

Относительная экспрессия IgG в ИФА отн-но MORO3080			hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1-40	hVL_1-47	hVL_1-51	hVL_2-11	hVL_2-14	hVL_2-23	hVL_3-1	hVL_3-21
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	hVH_1_2	A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.4	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0
2	hVH_1_18	B	0.4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.5	0.1	0.0	0.0	0.3	0.0	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.2	0.2
3	hVH_1_46	C	0.9	0.9	0.4	0.2	0.3	0.5	0.6	0.5	0.0	0.1	0.4	0.1	0.9	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3
4	hVH_1_69*01	D	0.9	0.5	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1
5	hVH_3_07	E	0.9	1.3	1.5	0.9	1.5	0.9	1.8	1.2	0.3	0.4	1.8	0.4	0.3	0.8	0.9	1.2	0.8	0.7	1.2	0.3
6	hVH_3_11	F	0.5	1.4	0.9	0.9	1.2	0.9	1.7	1.8	1.1	0.6	1.6	0.2	0.3	1.3	1.9	1.1	0.4	0.4	1.6	0.3
7	hVH_3_15	G	0.4	0.8	0.9	0.7	1.5	0.8	1.7	1.8	0.6	0.8	1.9	0.5	0.1	0.2	0.9	0.8	0.9	0.4	1.0	0.2
8	hVH_3_21	H	0.8	0.9	0.4	0.5	0.0	0.0	0.5	0.8	0.1	0.2	0.3	0.5	0.5	0.3	0.9	0.7	1.2	0.9	0.4	0.1
9	hVH_3_23	I	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.0	0.0	0.4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1
10	hVH_3_30	J	0.7	0.6	0.3	0.3	0.4	0.5	0.5	1.0	0.1	0.1	0.9	0.4	0.8	0.3	0.4	0.4	1.0	0.5	0.5	0.2
11	hVH_3_33	K	0.0	0.6	0.2	0.2	0.4	0.5	0.2	0.8	0.3	0.6	0.9	0.3	1.0	0.4	0.6	0.5	0.9	0.5	0.7	0.5
12	hVH_3_48	L	0.6	0.7	0.2	0.3	0.5	0.5	0.9	0.5	0.3	0.7	0.3	0.4	0.6	0.4	0.7	0.6	0.6	0.5	0.5	0.3
13	hVH_3_53	M	0.8	0.7	0.4	0.2	0.3	0.5	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.3	1.1	0.2	0.4	0.3	0.8	0.6	0.5	0.5
14	hVH_3_73	N	1.1	1.0	0.9	0.5	1.1	1.0	0.9	0.8	0.3	0.2	0.1	1.1	1.2	0.8	0.7	0.8	0.4	0.1	1.0	1.1
15	hVH_3_74	O	0.6	1.0	0.5	0.0	0.8	0.2	1.1	0.3	0.7	0.1	1.0	0.6	1.3	0.6	1.2	0.8	0.6	1.0	0.3	0.3
16	hVH_4_04*03	P	0.6	1.1	0.6	0.8	0.4	0.8	0.9	1.0	0.2	0.3	1.1	1.1	0.9	0.4	0.6	0.7	0.4	0.7	1.3	0.5
17	hVH_4_31	Q	0.0	0.2	0.6	0.4	0.0	0.2	0.0	0.5	0.0	0.0	0.1	0.4	0.8	0.1	0.3	0.2	0.5	0.3	1.3	0.4
18	hVH_4_39	R	0.3	0.8	0.7	0.9	0.5	1.0	0.4	1.2	0.2	0.2	1.0	1.2	1.1	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.9	0.6
19	hVH_5_51	S	0.4	0.9	0.5	0.8	0.5	0.6	1.0	1.2	0.7	0.6	1.2	1.1	1.3	0.8	0.5	0.3	0.8	0.7	1.3	0.7
20	hVH_6_1	T	0.0	1.2	1.3	1.1	1.4	1.3	1.2	1.1	0.3	0.9	1.3	1.3	1.4	0.2	0.5	0.2	0.4	0.4	1.4	0.5

Значения демонстрируют экспрессию IgG по сравнению с контролем; более высокие числа указывают на более высокие уровни экспрессии

Фиг. 60

Отн. стабильность IgG в сыворотке кр. рог. скота после 14 дней инкубации при 37°C			hVK_1_05	hVK_1_06	hVK_1_09	hVK_1_12	hVK_1_16	hVK_1_17	hVK_1_27	hVK_1_39	hVK_2_30	hVK_3_11	hVK_3_15	hVK_3_20	hVL_1-40	hVL_1-47	hVL_1-51	hVL_2-11	hVL_2-14	hVL_2-23	hVL_3-1	hVL_3-21
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	hVH_1_2	A	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg	bg
2	hVH_1_18	B	S	S	S	bg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	U	U	S	U	S
3	hVH_1_46	C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S
4	hVH_1_69*01	D	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S
5	hVH_3_07	E	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S
6	hVH_3_11	F	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S
7	hVH_3_15	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S
8	hVH_3_21	H	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	hVH_3_23	I	S	S	S	S	S	S	S	S	bg	bg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	hVH_3_30	J	S	S	S	S	S	S	S	S	bg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	hVH_3_33	K	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	hVH_3_48	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	hVH_3_53	M	S	S	S	S	S	S	S	S	bg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	hVH_3_73	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	hVH_3_74	O	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	hVH_4_04*03	P	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	hVH_4_31	Q	bg	bg	S	S	bg	bg	bg	S	bg	bg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	bg
18	hVH_4_39	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	hVH_5_51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	hVH_6_1	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S означает стабильный и U нестабильный в условиях тестирования; bg (фон)

Фиг. 61